



Desarrollo de nuevos métodos moleculares de control de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos de origen marino

Inmaculada Concepción Fernández No

LUGO, 2012

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultade de Veterinaria

Laboratorio de Higiene, Inspección e Control de Alimentos (LHICA)

Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía

D. Jorge Barros Velázquez, Catedrático del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

D^a. M. Pilar Calo Mata, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

AUTORIZAN A:

D^a. Inmaculada Concepción Fernández No, a la presentación de la tesis doctoral, titulada “*Desarrollo de nuevos métodos moleculares de control de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos de origen marino*” que presenta para optar al Grado de Doctora en Tecnología de Alimentos, que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) del Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman el presente documento en Lugo a 16 de diciembre 2011.

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Jorge Barros Velázquez', is written over a horizontal line.

Fdo.: Jorge Barros Velázquez

Fdo.: M. Pilar Calo Mata

Fdo.: Inmaculada C. Fernández No

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Quiero dar las gracias en primer lugar a mis directores de tesis, pues sin ellos este trabajo no habría sido posible: D. Jorge Barros Velázquez y D^a Pilar Calo Mata, gracias por vuestro apoyo constante, vuestra dedicación y supervisión, por vuestras ideas y consejos, por transmitirme parte de vuestros conocimientos y por guiarme y animarme en la búsqueda de resultados. Pero además, tengo que daros las gracias por el cariño y la amabilidad con la que me habéis tratado en todo este tiempo, gracias por hacer que por encima de la relación laboral y de trabajo haya el respeto y la unión de una familia. Muchas gracias a los dos.

Al director del laboratorio D. Alberto Cepeda Sáez por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y considerarme un miembro más del LHICA.

Al resto de los profesores del laboratorio D. Carlos Franco, D^a Cristina Fente, D^a Beatriz Vázquez y D. Jose Manuel Miranda por ser tan cercanos y accesibles en todo momento.

También deseo hacer constar mi agradecimiento a la Xunta de Galicia (Consellería de Innovación), por financiar una parte de estos estudios con un Contrato “Lucas Labrada” y por con los proyectos concedidos que también han permitido realizar el trabajo de esta tesis doctoral: “ Desarrollo de métodos rápidos de amplificación e hibridación del ADN para la detección e identificación de microbiota alteradora y patógena en alimentos de origen marino” (PGIDIT06PXIB261164PR) y “Desarrollo de un microarray para la identificación rápida de patógenos emergentes en alimentos listos para el consumo y mínimamente procesados” (10PXIB261045PR). Así como el proyecto del Ministerio “Desarrollo y aplicación de la reacción de detección de ligación acoplada a un array universal para la detección de bacterias patógenas y alterantes de productos marinos” (AGL2010-19646).

A Karola Böhme por enseñarme tanta tecnología e ingenio y mucho MALDI-TOF. Por los buenos momentos que hemos pasado y por el apoyo en los menos buenos. Gracias por mostrarme que se puede ver la vida desde un punto de vista diferente (menos gallego y más alemán). Karola he aprendido mucho de ti en todos los aspectos. Te deseo lo mejor. Serás una gran investigadora.

A Jose (José Manuel Miranda), por ter sempre tempo para axudar e explicar, por ser verdadeiro exemplo de dedicación e traballo, por ser un “currante” con maiúsculas ademais dunha excelente persona. Jose deséxoche o mellor que merécelo todo, aínda que te metas cos de Becerreá jejeje, moitas gracias.

Ás veciñas de enfrente, gracias polas risas que compartimos, polas veces que me escoitastes e por quitarme dalgún momento de fame jejejeje. A Rocío por todas as conversacións compartidas nas idas e vidas ó laboratorio, mira que intentamos arreglar o país, pero nada, non hai forma.... A Patri porque eres un “crack” ademais de traballadora como unha formiguiña, gracias por ser boa compañeira e axudarme sempre que te necesitei. A Chelo por todas as cheladas e por meterme caña (“a ver si acabas dunha vez, ¿escribiches o paper?, e ¿cando entregas? etc, etc....). E a Moni (kerubín) ¿acórdaste cando nos coñecemos?, qué aplicadiñas cos nosos proxectos fin de carreira jeje, xa choveu...; daquela xa eras unha boa compañeira, pero co tempo demostráchesme que tamén eres unha boa amiga.

E tamén teño que dar as gracias a Carolina, por ser tan amable e cercana dende o primeiro día e por animarme e transmitirme moitas veces o teu positivismo, a Mónica Guarddon por ser moi boa compañeira e axudarme sobre todo nos meus principios cando a microbioloxía se me resistía un pouco, ademais de compartir connigo algunha que outra risiña, e a Carmen porque dende que empecei no LHICA, tamén me ensinache moito de micro e sempre estiveche disposta a botar unha man. Gracias rapazas.

Marcos e Sonia, aínda que non fai moito tempo que nos coñecemos, xa pasamos bos momentos, gracias por ser tan majos e por facernos tan fácil traballar con vós, “sodes guais”.

Tamén quero acordarme doutros compañeiros cos que tamén compartín algún momento ó longo destes 4 anos no laboratorio: Rodrigo, Alejandra, Begonia, Sam, Alicia (a

de Jose), Rosa , Alberto ou incluso dalgúns que xa non están...

Pero como non todo é traballar, fora do LHICA tamén teño moitas persoas ás que quero dar as gracias, e non por deixalos de últimos son menos importantes:

Marco, teño moito que agradecerche. Eres a persoa máis noble e boa, que xamais coñecín, escoítasme e compréndesme tantas e tantas veces, sempre tes palabras de ánimo e intentas facerme ver o lado máis razoable, porque mira que son retorcida jeje. Gracias pola túa paciencia infinita e pola túa enorme simpatía e gracias por apoiarme en todo momento. Gracias por facerme disfrutar da túa familia e compartir bos momentos cos teus amigos. E...despois de máis de 10 anos, podería enumerar tantas e tantas virtudes..., pero como o párrafo que che dedico non o debería alargar moito máis, deixémolo en catro palabras: “¡¡¡¡ Paxa, gracias por quererme !!!!!”.

Teño que dar tamén as gracias a meus pais e a miña irmá, sodes os mellores que me puido dar a vida, sin o voso apoio nada sería posible.

NURI, realmente non sei por qué naciche máis tarde si eres a miña irmá maior, cuidachesme cando te necesitei e sei que aínda que non estés cerca ou que a vida nos separe fisicamente sempre serás a miña irmánciña e a miña mellor amiga, a que me da consellos sinceros e me anima cando estou baixa. Nuri, gracias por todo e porfí, segue aí sempre. Mauro coidama moito e nunca ma leves de todo jeje.

PAPÁ, gracias por estar aí, por apoiarme en todo momento, por darme sempre tan valiosos consellos, por repetirme varias veces “non te agobies, Lugo non se fixo en tres días”, por contar eses chistes tan raros (creo que o sentido do humor o heredei de ti, bueno, un pouco mellorado jejeje) e por tantas cousas máis...

MAMÁ, gracias por estar sempre aí, por ensinarme a respetar os demais, a ser boa persoa por encima de todo, por ser o exemplo máis grande de persoa traballadora, por educarme e facerme ver que con dedicación e constancia todo é posible, por transmitirme fortaleza e enerxía, gracias por coidarme e axudarme, por sorír sempre e ser tan estupenda, por escoítarme e entenderme, e por tantas outras cousas máis...

E ó resto da familia: ás avoas (a de Guillén por ser un terremoto e pura enerxía, e a da casa por ser exemplo de aguante e ganas de vivir, abuela para os 101 volvemos a

celebralo). A meus TÍOS (Nely e Andrés, Marisa e Milín, José e Lola, Jaime e Mariluz) e a meus primiños Carla, Laura, César, Paula, Pablo e Adrián (o meu afilladiño jeje), tamén gracias os da Pral, gracias Ana e Oki, os da Roda, a tía Pura, tía Claudia etc, etc... Gracias a todos por esas bonitas reunións familiares, polas comilonas e celebracións de festas, cumpleaños, vodas, Navidades..., gracias polas risas, polas conversacións, e sobre todo gracias por alegrarse coas miñas alegrías e entristecerse coas miñas tristuras, por apoiarnos, axudarnos nos malos momentos e querernos, gracias por compartir tantos e tantos momentos. Familia, oxalá esteades sempre aí.

As miñas amigas “out LHICA”, gracias Iria e Reme por seguir coas nosas reunións CTAs, por compartir conversacións e preocupacións da vida mesma e apoiarnos mutuamente. Gracias Rebeca por ser a miña amiga dende hai moitos moitos anos e por facerme ser un pouco constante nesto do deporte jejeje (xa me entendes). Sei que se vos necesito estaredes aí.

Agora, ó estar escribindo todo esto, un emociónase (menos mal que non me vedes jeje) e estoume dando conta que un só non é nada na vida... se ó final casi llelo debo todo ós demais jajajajaja. Bueno, pero como igual non teño outra ocasión de dar gracias a tanta xente e como todo esto a veces costa decilo de palabra, pois aproveitei esta ocasión e agora polo menos queda escrito. A TODOS, GRACIAS DE CORAZÓN.

ABREVIATURAS

ACN/TFA: acetonitrilo/ácido trifluoroacético

ADN: ácido desoxiribonucleico

16S ADNr: gen que codifica para el ARN que constituye la subunidad menos de los ribosomas bacterianos

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ATP: adenosina trifosfato

DMA: dimetilamina

DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas

E. coli- EHEC: *E. coli* enterohemorrágico

E. coli- EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

E. coli- EPEC: *E. coli* enteropatogénico

E. coli- ETEC: *E. coli* enterotoxigénico

EFSA: European Food Safety Authority (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria)

FA.: formaldehído

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización para la Agricultura y la Alimentación).

Hx: hipoxantina

HPLC: High-performance liquid chromatography. (Cromatografía de Alta Resolución)

IMP: inosina monofosfato

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry

OTMA: óxido de trimetilamina

OMS: Organización Mundial de la Salud

Abreviaturas

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

ppb: partes por billón

ppm: partes por millón

UFC: unidades formadoras de colonias

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RTi-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

μL: microlitro

RESUMEN

Los alimentos de origen marino son cada vez más apreciados por los consumidores, debido a sus excelentes propiedades nutricionales, representando el 15% del total de la ingesta de proteína animal. Las exigencias de un mercado cada vez más diversificado y la demanda por parte del consumidor de productos naturales, novedosos, fáciles de preparar y con un valor añadido a nivel nutricional, ha provocado en los últimos años la aparición de una notable cantidad de alimentos de origen marino que han irrumpido en el mercado europeo. Cada vez es mayor la demanda de productos mínimamente procesados, en los que se combinan diversos tratamientos tecnológicos para alcanzar la seguridad alimentaria del producto, el cual retiene en gran medida sus propiedades nutricionales y sensoriales. No obstante, la calidad de este tipo de productos puede verse afectada por la presencia de bacterias termoresistentes (fundamentalmente *Bacillus* spp.), capaces de formar endoesporas y provocar alteraciones de olor y textura, incluso durante el almacenamiento en refrigeración. Por otra parte, las bacterias productoras de histamina, las cuales sintetizan la enzima que lleva a cabo la descarboxilación del aminoácido histidina (la histidina-descarboxilasa), también son de preocupación en los alimentos de origen marino, pudiendo provocar su deterioro e incluso llamada intoxicación histamínicas.

Para investigar los agentes microbiológicos patógenos y alterantes en alimentos, se han venido utilizando las técnicas clásicas de aislamiento e identificación microbianas, las cuales son tediosas y precisan varios días para ser completadas. Es por ello que en los últimos años se ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de métodos sensibles y rápidos de detección e identificación microbianas. Así, recientemente el diagnóstico molecular ha experimentado una importancia creciente en la rápida detección e identificación de microorganismos patógenos y específicamente alterantes en el ámbito alimentario en general. El objetivo central perseguido en este trabajo ha seguido esta línea,

esto es el desarrollo de métodos moleculares, basadas en la genómica y en la proteómica, para lograr la identificación rápida y fiable de microorganismos patógenos y alterantes en productos marinos tanto frescos como aquellos elaborados a base de pescado y conservados por diferentes tratamientos tecnológicos. Para ello se han considerado algunas de las especies microbianas de mayor relevancia en este ámbito, al ser potencialmente comprometedoras de la seguridad alimentaria en alimentos en general y en productos de origen marino en particular. Como dianas moleculares se han considerado el gen 16S del ADN_r, el cual ha sido sometido a amplificación mediante técnicas de PCR convencional o PCR en tiempo real, secuenciación y análisis filogenético, así como la fracción del proteoma intracelular inferior a 15 kDa empleando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Ambas estrategias, basadas en el análisis genético y proteómico, se combinan en este estudio con el fin de evaluar sus ventajas, limitaciones y complementariedad.

Para llevar a cabo el objetivo general marcado en la presente tesis doctoral se ha organizado el estudio en diversos objetivos parciales que se resumen a continuación:

1. Caracterización de bacterias productoras de histamina aislada de besugo (*Pagellus bogaraveo*) y rodaballo de acuicultura (*Psetta maxima*)

Rodaballo (*Psetta maxima*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*) son dos de las más importantes especies emergentes en la acuicultura europea. Sin embargo hasta el momento no se ha publicado información alguna en relación a la presencia y desarrollo de bacterias productoras de histamina en ellos. Este objetivo se ha centrado en el aislamiento e identificación de las principales bacterias productoras de histamina en rodaballo y besugo

de acuicultura. Con este fin, se seleccionaron de manera preliminar en medio de Niven, 24 cepas microbianas (12 de rodaballo y 12 de besugo). Dos de estos aislamientos fueron confirmados como productores prolíficos de histamina mediante HPLC. Así, *Pseudomonas fragi* (aislada de rodaballo) y *Pseudomonas syringae* (aislada de besugo) produjeron 272 ± 69 ppm y 173 ± 45 ppm de histamina *in vitro*, respectivamente, tras incubación a 30 °C/24 h. Mientras que los filetes de rodaballo demostraron ser bastante resistentes a la formación de histamina a temperaturas inferiores a 10 °C, los filetes de besugo inoculados con *P. syringae* o la especie productora de histamina *Morganella morganii* acumularon 696 ± 84 y 760 ± 59 ppm de histamina, respectivamente, en esas condiciones. La identificación genética basada en la secuencia del gen 16S ADNr se llevó a cabo en paralelo con el análisis mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) de los perfiles espectrales de masas característicos de las cepas. La identificación bacteriana se logró por la detección de seis picos de masa específicos a nivel de especie en el rango de 2534-7183 m/z y 2536-9113 m/z para *P. fragi* y *P. syringae*, respectivamente. Asimismo, seis picos específicos de género y con valores de masas en el rango de 2218-4434 m/z fueron compartidos por ambas cepas.

2. Caracterización diferencial de bacterias productoras de aminas biógenas relacionas con intoxicaciones histamínicas por espectrometría de masas MALDI-TOF.

La intoxicación histamínica es un síndrome de origen alimentario producido por el consumo de alimentos con niveles elevados de esta amina biógena. Se asocia comúnmente con el consumo de pescados escómbridos (atún, albacora, listado, bonito, caballa, etc.), de ahí el nombre “envenenamiento o intoxicación por escómbridos” con el que se le denomina frecuentemente debido a que fue donde primero se detectó. Sin embargo, la

intoxicación histamínica también puede ser debida al consumo de pescados no escómbridos como anchoas, sardinas, arenques, etc., o de otros alimentos como quesos, productos cárnicos, vino, etc. Los síntomas que produce son de naturaleza básicamente neurológico-cutánea y gastrointestinal ejerciendo asimismo acción sobre el aparato cardiovascular, músculo liso y glándulas endocrinas.

La histamina es un producto secundario del metabolismo de ciertas bacterias que están presentes en el alimento, produciéndose dicha amina biógena por acción de la enzima histidin descarboxilasa, que transforma la histidina del músculo del pescado en histamina. Para evitar esta intoxicación y con el fin de prevenir la formación de histamina, es importante la detección e identificación rápidas de las bacterias responsables de producir ésta y otras aminas biógenas.

En esta fase del estudio se aplicó por vez primera la técnica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) con el fin de obtener los espectros de masas de las 16 principales bacterias productoras de aminas biógenas (mayoritariamente histamina) descritas a nivel internacional. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas bacterianas analizadas poseían perfiles espectrales específicos, lo que permitió su diferenciación inequívoca. Por medio de esta técnica también se identificaron picos comunes a ciertos grupos de bacterias. Así, dos picos de proteínas con masas 4182 ± 1 y 8363 ± 6 m/z resultaron estar presentes en todas las especies de Enterobacterias analizadas excepto en *Morganella morganii*. Picos con masas 3635 ± 1 y 7267 ± 2 m/z resultaron asimismo específicos de *M. morganii* y *Proteus* spp. Las bacterias productoras de aminas biógenas pertenecientes al género *Proteus* exhibieron tres picos específicos de género en 3980, 7960 ± 1 y 9584 ± 2 m/z. El género *Photobacterium* también mostró tres picos específicos de género 2980 ± 1 , 4275 ± 1 y 6578 ± 1 m/z. Las dos bacterias Gram-positivas, *Lactobacillus* sp. 30A y *Staphylococcus xylosus*, mostraron un escaso

número de picos de proteínas entre 2000-7000 m/z, pudiendo ser fácilmente diferenciables de las bacterias productoras de aminas biógenas Gram negativas. El análisis filoproteómico también mostró una buena correlación con respecto al análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S ADNr.

El enfoque descrito en este estudio abre el camino hacia la identificación rápida y específica de las principales bacterias productoras de aminas biógenas en base a marcadores proteicos, con el objetivo final de prevenir la intoxicación alimentaria asociada al consumo de alimentos con altos niveles de histamina.

3. Aislamiento y caracterización de *Streptococcus parauberis* aislado de un producto marino refrigerado y envasado a vacío.

Streptococcus parauberis es un agente etiológico de mastitis en vacas y también de estreptococosis en peces de acuicultura, aunque su presencia en alimentos rara vez se ha observado. En esta fase del estudio, se aislaron dos cepas bacterianas a partir de un producto elaborado a base de pescado envasado al vacío y refrigerado. Ambas cepas fueron identificadas por secuenciación del gen 16S ADNr, mostrando una homología del 99% con respecto a *S. parauberis*, siendo asimismo caracterizadas mediante MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). El análisis genético reveló la homogeneidad clonal de los aislamientos y su agrupación junto a otras cepas de *S. parauberis* en un grupo diferente con respecto a las cepas pertenecientes a la especie *S. uberis*. El análisis proteómico mediante MALDI-TOF MS permitió la identificación de cinco picos de masas en el rango de 2200-6000 m/z que resultaron ser específicos de la especie *S. parauberis*, permitiendo su identificación rápida y directa con respecto a otros patógenos y bacterias alterantes presentes en productos de origen marino y otros alimentos. Este estudio representa, a nuestro entender, la primera publicación sobre el

aislamiento de *S. parauberis* en pescado en general y en productos marinos envasados al vacío, en particular. Además, proporciona un método rápido basado en MALDI-TOF MS para la identificación rápida de *S. parauberis*.

4. Detección y cuantificación de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* patógenos y alterantes por PCR en tiempo real

Bacillus cereus, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* son especies bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, esporoformadoras y por lo tanto resistentes a tratamientos térmicos. De ahí que estas bacterias puedan estar presentes en alimentos tanto frescos como pasteurizados. En esta fase del estudio se ha desarrollado una metodología basada en la técnica PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación de dichas especies. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos y una sonda tipo TaqMan. En el presente estudio se consideraron 48 cepas bacterianas pertenecientes a estas especies, extrayéndose el ADN y amplificándose un fragmento del gen 16S ADNr. Los amplicones se secuenciaron y las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de referencia del GenBank, seleccionándose secuencias consenso para las tres especies seleccionadas. Asimismo, con el fin de establecer el método de cuantificación se construyeron 2 curvas de RTi-PCR, una a partir de ADN extraído de cultivos de *B. cereus* diluidos en serie, así como una segunda curva con ADN extraído de un producto alimentario esterilizado e inoculado posteriormente con diluciones seriadas de *B. cereus*. Las curvas exhibieron valores de R² de 0.9969 y 0.9958, respectivamente. La correlación linear entre log₁₀ de la concentración de ADN y el valor del ciclo umbral de amplificación (Ct) se mantuvo en un rango de 1.65×10^1 CFU/mL hasta 1.65×10^6 CFU/mL para ambas curvas estándar. La especificidad de los oligonucleótidos y de la sonda fue testada con ADN extraído de cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*, con los cuales se obtuvieron valores de Ct entre

14 y 15, mientras que se detectaron amplificaciones inespecíficos de ADN extraído de otras especies bacterianas de interés alimentario a valores de Ct por encima de 28.5. A nuestro entender, este método representa el primer estudio de determinación simultánea de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* patógenas o alterantes en productos alimentarios, con el fin de prevenir y detectar precozmente su presencia en la cadena alimentaria.

5. Caracterización de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* por espectrometría de masas MALDI-TOF

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, que incluye especies como *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, son patógenas y ampliamente consideradas como alterantes de los alimentos. Este objetivo consistió en aplicar Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) para la clasificación e identificación de estas especies de *Bacillus*. En este trabajo se consideró asimismo el análisis genético de polimorfismos (SNPs) en el gen 16S ADN_r, y se comparó con los análisis filogenético y filoproteómico. Para ello, se estudió una colección de 52 cepas de *Bacillus* aisladas de alimentos frescos y procesados, así como diversas cepas de referencia de colecciones internacionales. Los espectros y las listas de masas resultantes se compararon, lo que permitió asignar picos característicos tanto a nivel de cepa como a nivel de especie bacteriana. Los resultados mostraron que la técnica MALDI-TOF aporta un enfoque complementario y más poderoso que la secuenciación del gen 16S ADN_r en la clasificación correcta de las especies de *Bacillus*, sobre todo para diferenciar *B. subtilis* y *B. cereus* de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, respectivamente. Tanto el análisis MALDI-TOF como el análisis de SNPs proporcionaron información valiosa, tanto a nivel intra e interespecíficas, en las especies de *Bacillus* estudiadas.

Las técnicas genómicas y proteómicas son herramientas de vital importancia para la identificación rápida y específica de microorganismos patógenos y alterantes en productos de la pesca frescos y elaborados. Actualmente la secuenciación del gen 16S ADN_r está ampliamente empleada para la identificación bacteriana, y su veracidad y fortaleza está claramente demostrada. Metodologías basadas en el análisis de proteínas representan una alternativa complementaria a métodos genómicos, ya que reducen el tiempo de análisis, tienen un bajo coste y también muestran una alta precisión y sensibilidad. Así, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo al usar la técnica de espectrometría de masas por MALDI-TOF, se demuestra que esta técnica proteómica confirma y completa el análisis genético basado en la secuenciación del gen 16S ADN_r. Además MALDI-TOF MS demuestra ser una técnica apropiada y de una alta fiabilidad para la diferenciación e identificación de bacterias, permitiendo obtener perfiles espectrales y listas de masas característicos a nivel de género, especie e incluso cepa bacteriana. Los dendrogramas obtenidos del análisis proteómico muestran una buena correlación con respecto los análisis filogenético.

Teniendo en cuenta los diferentes objetivos del estudio, es importante destacar las conclusiones obtenidas de una forma más pormenorizada, por lo que a continuación se enumeran conclusiones específicas correspondientes a cada uno de las etapas en las que se organizó el estudio:

1. *Pseudomonas syringae* es un notable productor de histamina, generando concentraciones de esta amina en músculo de besugo similares a las producidas por *Morganella morganii*. Por otra parte, si bien el rodaballo de acuicultura es resistente a la formación de histamina a temperaturas inferiores a 10 °C, el besugo debe ser considerado una especie susceptible de mediar episodios de intoxicación histamínica alimentaria.

2. El análisis MALDI-TOF MS permite una rápida identificación de *Pseudomonas fragi* y *P. syringae*, principales bacterias productoras de histamina aisladas de rodaballo y besugo de acuicultura, respectivamente, permitiendo asimismo definir biomarcadores específicos que permiten su detección rápida en productos alimentarios.
3. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta sensible y rápida para la detección e identificación de las principales bacterias productoras de aminas biógenas, proporcionando espectros y listas de masas característicos de cada especie bacteriana. El estudio filoproteómico realizado en este trabajo resultó idóneo para el agrupamiento microbiano, confirmando los resultados del análisis filogenético basado en el gen 16S ADNr.
4. *Streptococcus parauberis* puede causar la alteración de productos de la pesca refrigerados envasados al vacío limitando su vida útil, por lo que debe ser considerado como microorganismo específicamente alterante en este grupo de alimentos. En este estudio se han definido biomarcadores proteicos específicos que permiten su identificación directa en alimentos mediante MALDI-TOF.
5. Se ha desarrollado un método original de RTi-PCR que permite la determinación de *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* en alimentos frescos o pasteurizados, lo que puede permitir un control microbiológico estricto de estas especies patógenas y alterantes en todo tipo de alimentos.
6. Los picos de masa recopilados en este estudio han resultado ser biomarcadores útiles para la rápida identificación y clasificación de especies del género *Bacillus* patógenas y alterantes de alimentos. Así, el análisis mediante MALDI-TOF permite la diferenciación de las especies pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*) y al grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus* y *Bacillus*

thuringiensis), mejorando de este modo el diagnóstico genético mediante secuenciación del gen 16S ADNr.

7. Se ha confirmado la presencia de SNPs en el 16S ADNr en el género *Bacillus*, describiéndose por vez primera en el presente estudio mutaciones en ciertos *loci* que deberán tenerse en cuenta para el diseño adecuado de oligonucleótidos y sondas orientadas a la investigación de estas especies en alimentos mediante PCR y microarrays.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pescado en nuestra dieta	3
1.2. Calidad y seguridad de los alimentos de origen marino	4
1.2.1. Alteración microbiológica de los alimentos de origen marino.....	7
1.2.2. Bacterias patógenas en alimentos de origen marino.....	9
1.2.3. <i>Bacillus</i> spp.	13
1.2.4. Producción microbiológica de aminas biógenas. Histamina.....	15
1.2.4.1. Histamina en alimentos de origen marino.....	18
1.2.4.2. Presencia de histamina en alimentos de origen marino.....	20
1.2.4.3. Perspectiva legal.....	21
1.2.4.4. Formación de histamina.....	21
1.2.4.5. Bacterias productoras de histamina.....	23
1.2.5. <i>Streptococcus parauberis</i>	25
1.3. Detección e identificación bacterianas en alimentos de origen marino	27
1.3.1. Métodos clásicos	27
1.3.2. Métodos genómicos.....	29
1.3.2.1. Métodos genómicos en la identificación de <i>Bacillus</i>	35
1.3.2.2. Métodos genómicos para la identificación de bacterias productoras de histamina.....	36
1.3.2.3. Métodos genómicos en la identificación de <i>Streptococcus parauberis</i>	37
1.3.3. Métodos proteómicos	37
1.3.3.1. Análisis MALDI-TOF.....	38
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivo general	45
2.2. Objetivos específicos	45

3. RESULTADOS.....	47
3.1. Capítulo 1: Caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>) y rodaballo de acuicultura (<i>Psetta maxima</i>).....	49
3.2. Capítulo 2: Caracterización diferencial de bacterias productoras de aminas biógenas relacionas con intoxicaciones histamínicas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	61
3.3. Capítulo 3: Aislamiento y caracterización de <i>Streptococcus parauberis</i> aislado de un producto marino refrigerado y envasado al vacío.....	77
3.4. Capítulo 4: Detección y cuantificación de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> patógenos y alterantes de alimentos mediante PCR en tiempo real.....	87
3.5. Capítulo 5: Caracterización de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	97
4. DISCUSIÓN.....	141
4.1. Caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>) y rodaballo de acuicultura (<i>Psetta maxima</i>).....	143
4.2. Caracterización diferencial de bacterias productoras de aminas biógenas relacionas con intoxicaciones histamínicas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	147
4.3. Aislamiento y caracterización de <i>Streptococcus parauberis</i> aislado de un producto marino refrigerado y envasado al vacío.....	151
4.4. Detección y cuantificación de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> patógenos y alterantes de alimentos mediante PCR en tiempo real.....	154

4.5. Caracterización de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	157
5. CONCLUSIONES.....	161
5.1. Conclusión general	163
5.2. Conclusiones específicas.....	163
6. REFERENCIAS.....	167
7. ANEXO: Secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI).....	187

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Pescado en nuestra dieta

El pescado es un alimento básico y muy presente en nuestra dieta: Su amplia variedad de presentaciones comerciales hacen que sea un alimento muy aceptado por el consumidor. Al pescado fresco, ahumado, congelado, salado o a los también tradicionales productos refrigerados o congelados a base de pescado se unen nuevos productos como platos preparados o precocinados, surimis, rebozados, etc.

El pescado está considerado un alimento digestivo, nutritivo y saludable; por lo tanto apto para todo tipo de personas, incluso aquellas que poseen alguna dolencia. La preocupación por la salud y por llevar una dieta equilibrada, son el principal motivo del consumo de pescado. Aporta indudables beneficios, su consumo es apropiado para cualquier edad, contribuye a prevenir enfermedades, su aporte calórico es en general moderado, aporta vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles así como algunos minerales, contiene proteínas de excelente calidad, presenta un perfil de lípidos más saludable que el de otros alimentos también ricos en proteínas como las carnes y es fuente natural de ácidos grasos Omega 3. Así, el consumo de pescado, y en concreto de pescado azul, puede mejorar los síntomas de algunas enfermedades y contribuir a la prevención de otras, entre las que destacan las cardiovasculares. Por poseer importantes propiedades nutricionales, el pescado se convierte en un alimento fundamental dentro de lo que se considera una alimentación equilibrada y cardiosaludable.

España se sitúa en los primeros puestos en el consumo mundial de productos pesqueros, justo detrás de Japón y Portugal. De hecho, según se desprende de los últimos datos disponibles del Panel de Consumo del año 2008 del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, el pescado llega al 70% de la población a lo largo del año, alcanzando a un mayor número de hogares de enero a mayo, con un consumo medio de 1,20 kilos por persona al mes (MARM, 2008).

Cada año se producen más de 100 millones de toneladas de pescado y productos pesqueros en todo el mundo, incluida la pesca natural y la acuicultura, de las cuales más de las tres cuartas partes son utilizadas como alimento para las personas. El resto se emplea para elaborar diferentes productos, sobre todo aceites y harinas. De las toneladas destinadas a la alimentación, la mayor parte se consume como pescado fresco y el resto se conserva, congelado, enlatado, curado, etc.

Recientemente, el sector pesquero ha sufrido una disminución de las poblaciones de especies tradicionales como resultado de cambios importantes en su disponibilidad, lo que ha motivado el desarrollo de técnicas de acuicultura para proveer pescado y otros alimentos de origen acuático (Alvarez y col., 2009). Entre las especies de peces de piscifactoría de emergente valor comercial se encuentran el besugo (*Pagellus bogaraveo*) y el rodaballo (*Psetta maxima*): ambos son apreciados por su carne firme y sabrosa. La acuicultura ha hecho recientemente estas dos especies más disponibles para los consumidores de los países europeos (Rodríguez y col., 2003).

1.2. Calidad y seguridad de los alimentos de origen marino

En la última década en Europa, casos como la encefalopatía espongiforme bovina o enfermedad de las vacas locas, la presencia de bacterias patógenas y alterantes, en los alimentos, el descubrimiento de las dioxinas y otros contaminantes químicos en los pollos y en ciertos pescados, el empleo de antibióticos en la ganadería y la llegada de los organismos genéticamente modificados (OGM) han despertado la conciencia y la preocupación de los consumidores por la seguridad alimentaria.

Se estima que tres millones de personas de todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los en vías de desarrollo, mueren cada año a consecuencia de

enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua, y que millones enferman (FAO, 2010). La aparición de tales enfermedades puede incrementarse fácilmente y convertirse en una situación de emergencia relacionada con la inocuidad de los alimentos, lo que afectaría negativamente a las economías nacionales y a los medios de subsistencia debido a una menor disponibilidad de alimentos para el consumo nacional, el cierre de los mercados de exportación y/o el elevado costo de abordar los efectos de la amenaza. Ello no sólo es debido al aumento del número de casos relacionados con la inocuidad de los alimentos notificados, sino también a la mayor globalización y complejidad de la cadena alimentaria.

La presencia de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos es uno de las principales preocupaciones de la administración, la industria alimentaria y los consumidores, por lo tanto, la identificación de ciertas especies microbianas es esencial tanto en el análisis clínico con el fin de la detección y correcto tratamiento de enfermedades humanas, como en el sector alimentario para la detección precoz de patógenos transmitidos por alimentos como el pescado, lo que permite controlar y minimizar los riesgos microbiológicos de dichos productos (Marth, 1998). Esta inquietud ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de procesos de conservación cuyo objetivo es destruir las células microbianas o retrasar su crecimiento, así como al perfeccionamiento de los sistemas de detección existentes y a la creación de nuevos métodos más rápidos y precisos que permitan un pronóstico más diligente de los productos, tanto a la propia industria como a las autoridades sanitarias.

En los últimos años se ha efectuado una profunda revisión, en respuesta a las alarmas alimentarias previamente comentadas, que en la década de 1990 coparon los titulares de las noticias en relación con temas como la enfermedad de las vacas locas, los

piensos contaminados con dioxinas o el aceite de oliva adulterado. Para hacer frente a este problema, la Unión Europea (UE) está aplicando una estrategia global, basada en una combinación de normas alimentarias, zoonosanitarias y fitosanitarias muy rigurosas que se aplican tanto a los alimentos producidos en la UE como a los importados, con el fin de que los ciudadanos vuelvan a confiar en la seguridad de los alimentos. La política de la UE engloba toda la cadena alimentaria, “de la granja a la mesa”, y establece una amplia legislación, siendo una de las más estrictas del mundo.

Desde el 1 de febrero de 2002, los países miembros de la UE se han dotado de un concepto jurídico común para designar a los alimentos, al publicarse en el DOCE el Reglamento CE núm. 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002 (DOCE núm. L031/1, 2002). En este Reglamento se establecen los principios y los requisitos de la legislación alimentaria, se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria, y se crea además la European Food Safety Authority (EFSA). La EFSA trabaja en colaboración con diversas instituciones y organismos científicos de los países miembros de la UE. En el caso de España, existe un organismo específico para este fin, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), que tiene como misión garantizar el más alto grado de seguridad y promover la salud de los ciudadanos.

“Del campo o de la granja a la mesa”. Con esta frase los organismos encargados de velar por la seguridad alimentaria en la Unión Europea, junto con la OMS y la FAO, quieren expresar que el control llevado a cabo sobre los alimentos, es una responsabilidad que atañe a todos los participantes de la cadena alimentaria, desde los productores primarios (agricultores, ganaderos) a los procesadores, envasadores, transportadores, almacenistas, puntos de venta y, por último, a los consumidores. Por tanto, las medidas concernientes a la vigilancia y control de dicha seguridad alimentaria, deben cubrir

exhaustivamente todas y cada una de estas etapas, de manera que quede garantizada la inocuidad de todos y cada uno de los alimentos que llegan a la mesa del consumidor.

1.2.1. Alteración microbiológica de los alimentos de origen marino

El deterioro post-mortem en productos de origen marino es un proceso rápido debido a la acción de varios factores como la actividad autolítica, el metabolismo bacteriano y algunas reacciones químicas como oxidación de los lípidos y decoloraciones (Rodríguez y col., 2003). Todos estos mecanismos resultan en un cambio estructural y bioquímico de los productos marinos, que tienen un fiel reflejo en la apariencia y en las características sensoriales de estos. Tanto las características a nivel externo (tacto, vista, olfato) como a nivel culinario (color, sabor, textura y olor) implican un primer examen para determinar el grado de frescura de los productos y, por tanto, el valor económico o su nivel de rechazo.

Inmediatamente tras la muerte de pez comienza la alteración aunque es difícil determinar la calidad y frescura de los productos marinos ya que el proceso del deterioro transcurre gradualmente. La velocidad de la alteración depende de diferentes factores como la especie, el tamaño, la riqueza en lípidos, el estado del pescado en el momento de la captura, la importancia y naturaleza de la contaminación bacteriana y, sobre todo, el método de conservación. La degradación se lleva a cabo en una primera etapa por enzimas propias del músculo del pescado y posteriormente por enzimas producidas por los microorganismos que acceden al músculo. En la primera fase, los mecanismos autolíticos determinan la pérdida de la calidad de los productos marinos. El cambio más dramático es el desencadenamiento del rigor mortis en el que el músculo se contrae por el déficit de ATP. El cuerpo se vuelve totalmente inflexible y generalmente se mantiene así durante uno

o más días hasta que el músculo recupera la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al rigor (Huss y col., 1995).

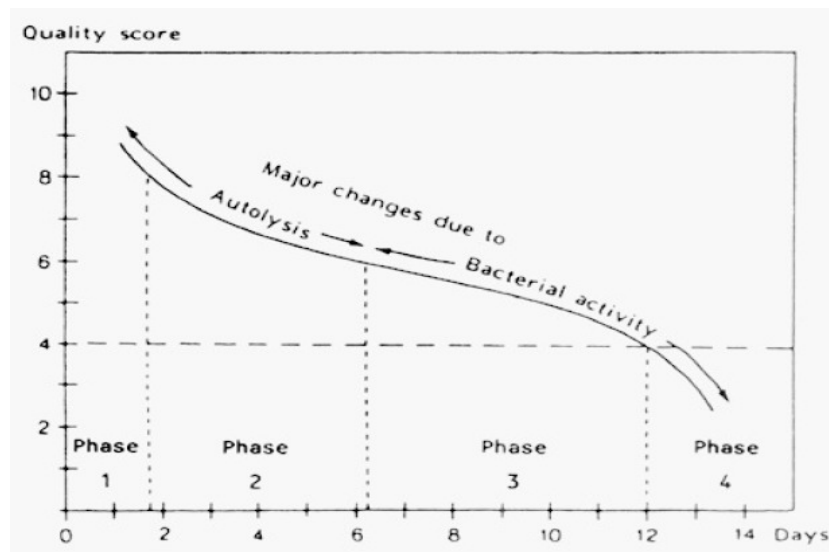


Figura 1: Degradación post-mortem de productos marinos (Huss y col., 1995)

En comparación a otros alimentos, los productos marinos contienen pocos carbohidratos, muchos aminoácidos libres, siendo los lípidos especialmente ricos en ácidos grasos poliinsaturados. La consecuente oxidación de los lípidos resulta en la formación de hidroperóxidos que pueden causar coloraciones pardas y en la liberación de aldehídos y cetonas con un sabor rancio. Esta reacción no tiene tanta importancia en el deterioro de los productos marinos, pero es un proceso que se inhibe por la congelación. La degradación autolítica de los carbohidratos, nucleótidos y compuestos nitrogenados implica la formación de una variedad de productos, debido a la acción de enzimas propias del músculo. Entre ellos, se pueden incluir la descomposición de ATP en hipoxantina (Hx) y la reducción del óxido de trimetilamina (OTMA) a dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA). El formaldehído aumenta la desnaturalización de las proteínas y por eso cambia la textura del músculo y disminuye la capacidad de retención del agua.

Estos procesos autolíticos tienen efecto tanto en la textura, como en el sabor y olor propios de los productos marinos. Estos cambios disminuyen la calidad de dichos

productos pero, sin embargo, no son los responsables del mal olor “a pescado”. El deterioro ocurre en una segunda fase debido a la actividad de bacterias que producen la mayoría de las sustancias volátiles asociadas a un cambio de las propiedades organolépticas como, un olor inaceptable y productos alterados, poco agradables al gusto. Un gran número de microorganismos han sido aislados de pescado deteriorado: *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, entre otros (Mossel y col., 2006).

1.2.2. Bacterias patógenas en alimentos de origen marino

Un alimento contaminado puede transmitir una enfermedad debido a que se puede convertir en un medio de crecimiento de bacterias patógenas que causan enfermedad o producen ciertas toxinas. La incidencia global de enfermedades transmitidas por alimentos es difícil de estimar, pero se estima que sólo en 2005 1.8 millones de personas han muerto por enfermedades diarreicas. Una gran proporción de estos casos puede ser atribuida a la contaminación de comida y agua de consumo. En los países industrializados, el porcentaje de población que sufre enfermedades transmitidas por alimentos es superior al 30 % (WHO, 2007).

En los últimos años, la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos y producidas por bacterias ha aumentado considerablemente con el consiguiente impacto social y económico. En la Figura 2 se representan los datos de los patógenos responsables de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España en el periodo 2004-2007 publicados en la “Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica”. El número total de brotes fue de 3.466 de los cuales el agente causal de origen bacteriano fue del 56,95% de los casos.

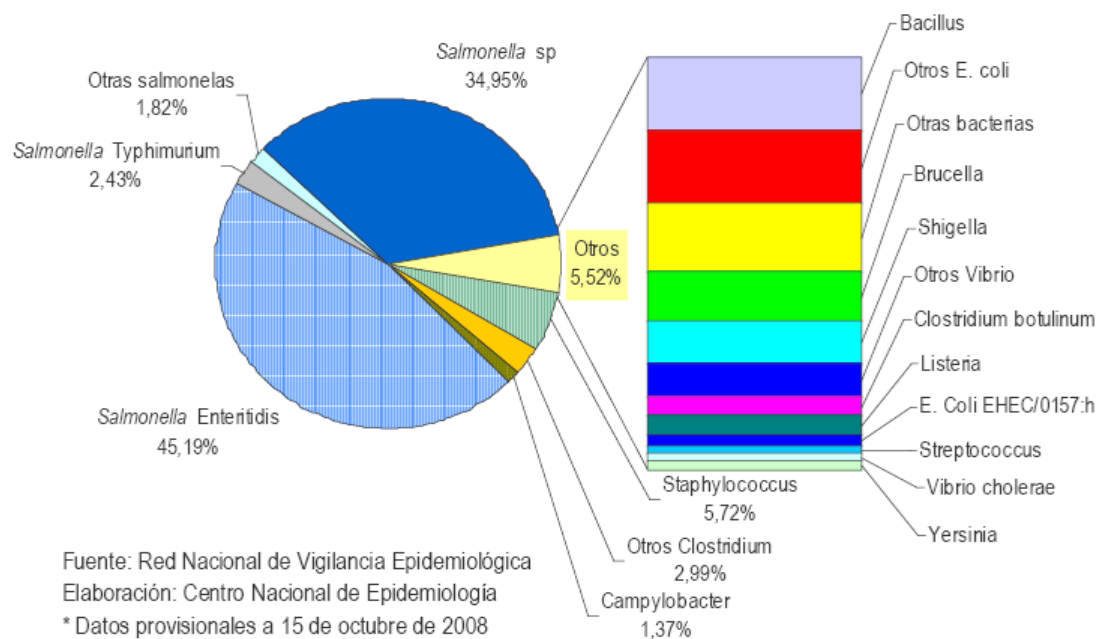


Figura 2: Patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos

Las intoxicaciones alimentarias (Tabla 1 y 2) son comúnmente causadas por bacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*., *Shigella* spp., *Streptococcus* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*. O por otras cuya patogenicidad se ha descubierto más recientemente y que son denominadas “patógenos emergentes” como *E. coli* O157:H7, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Mycobacterium* spp., *Helicobacter* spp. no gástrico, *Enterobacter sakazakii*, o ciertas especies de *Campylobacter*.

Patógeno	Características de la enfermedad		Características de crecimiento			Alimentos implicados
	Tiempo de inicio	Duración	T (°C)	pH	Aw	
<i>Bacillus cereus</i>	Toxina diarreica: 6-15h., Toxina emética : 0.5-6h.	24 h.	5-131	4.9-8.8	0.93	Arroz, carnes, productos lácteos, vegetales, pescado, pasta, sopas ensaladas
<i>Clostridium botulinum</i> Typo A, B (proteolítico) y Tipo E	18-36 h. (h.-17días)	meses	10-50	4.6-8.5	0.93	Tierra, mamíferos, alimentos preparados en el hogar, conservas de pescado
<i>E. coli</i> - EHEC (ie. <i>E. coli</i> O157:H7)	3-4 días (1-9 días)	2-9 días	7.2-49.4	4.4-9	0.95	Carne de ternera picada, leche cruda, salchichas, sidra de manzana, agua, vegetales crudos y brotes y productos agrícolas.
<i>E. coli</i> - EIEC, disenteria bacilar	12-72 h.	incierto	7.2-49.4	4.4-9	0.95	Agua, queso, ensalada, salmón en lata
<i>E. coli</i> - EPEC, diarrea infantil	17-72 h.	6 h.-3días	7.2-49.4	4.4-9	0.95	Agua embotellada contaminada, pastel de carne y carne de cerdo
<i>E. coli</i> - ETEC, diarrea del viajero	24-44 h. (10-72 h.)	3-5 días (3-19 días)	7.2-49.4	4.4-9	0.95	Agua, queso y marisco
<i>Listeria monocytogenes</i>	3 días-3 semanas (hasta 70 días)	incierto	-1-30	4.4-9.4	0.92	Productos lácteos, vegetales, carne, ave de corral, pescado, productos listos para comer, leche cruda
<i>Salmonella</i> no-typhi	12-36 h. (6-72 h.)	1-7 días	5-46	4.2-9.5	0.94	Carne, ave de corral, marisco, huevos crudos y mal cocidos, leche cruda, salsas, melones, mangos, chocolate

Tabla 1. Principales bacterias patógenas con los alimentos en los que suelen encontrarse, entre ellos pescados y mariscos, y los síntomas que provocan en el consumidor.

Patógeno	Características de la enfermedad		Características de crecimiento			Alimentos implicados
	Tiempo de inicio	Duración	T (°C)	pH	Aw	
<i>Salmonella typhi</i>	1-3 semanas (3 días – 3 meses)	incierto	5-46	4.2-9.5	0.94	Agua contaminada y alimentos: frutas crudas y vegetales, leche y marisco crustáceos
<i>Shigella</i> spp.	12-96 h.	4-7 days	5-7.8	4.9-9.3	0.97	Ave de corral, carne, pescado, frutas, productos lácteos, y productos de panadería, ensalada y agua no tratada
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 h.	6-24 hr	5-50	4.0-10	0.83 (crecimiento) 0.88 (toxina)	Ave de corral, carne ensaladas, productos de panadería y pastelería, sandwiches, productos lácteos jamón cocido, productos lácteos
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1-3 días	variable	-	-	-	Leche, helado, huevos, langostas al vapor, jamón, ensalada de patatas y huevos, natilla, ensalada de gambas
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12-24 h. (4-96 h.)	4-7 días	5-42.8	4.8-11	0.94	Marisco (crustáceo) y pescados
<i>Vibrio cholerae</i> 01	6 h.-5 días	Horas a días	5-42.8	-	-	Marisco
<i>Vibrio cholerae</i> no-01	6 h.-3 días	6-7 días	5-44	-	-	Ostras
<i>Vibrio vulnificus</i>	24-48 h. (12-72 h.)	-	7.8-42.8	5.0-10.2	0.96	Ostras y mariscos crudos o mal cocidos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3-7 días	1-3 días (2-3 semanas)	-1-42	4.2-9.6	0.97	Leche cruda, vegetales, helados, carne de cerdo ensalada y marisco

Tabla 2. Principales bacterias patógenas con los alimentos en los que suelen encontrarse, entre ellos pescados y mariscos, y los síntomas que provocan en el consumidor.

1.2.3. *Bacillus* spp.

El género *Bacillus* fue descrito en 1872 por Ferdinand Cohn, un contemporáneo de Robert Koch, y se encuentra dentro de la familia *Bacillaceae* (Vos, 2009). Son bacterias caracterizadas por una morfología alargada, simulando un bastón, pudiendo ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas. Son esporógenas, por lo que generalmente se encuentran como agentes de alteración de alimentos que en algún momento fueron sometidos a calentamiento. En el caso de la especie *Bacillus cereus* la mayoría de las cepas son patógenas causando cuadros de enteritis o gastroenteritis. Cada bacteria crea una sola spora, que es resistente al calor, al frío, a la radiación, por lo que su fisiología le permite vivir en un amplio número de hábitats, incluyendo hábitats extremos. Algunas de las especies del género *Bacillus* pueden incluso ser termófilas, psicrófilas, acidófilas, halotolerantes o halófilas y son capaces de crecer en condiciones de pH, temperatura y concentraciones de sal en las que pocos organismos pueden sobrevivir.

En la Figura 3 se muestra la distribución de riesgos alimentarios del año 2009, en donde se aprecia una incidencia del 3% en el caso de *Bacillus*.

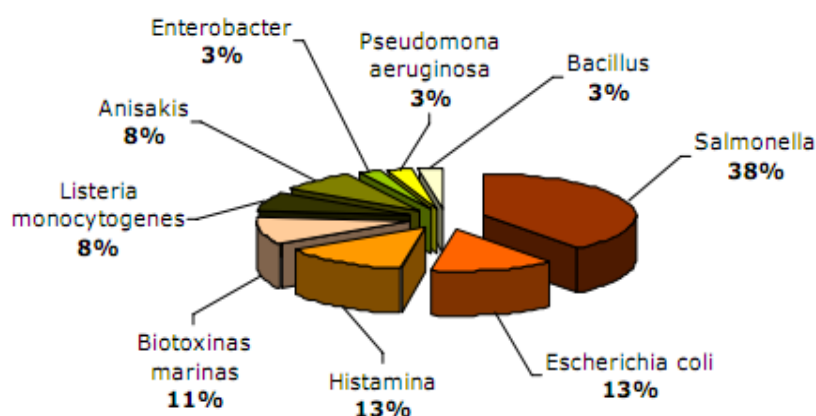


Figura 3: Distribución de riesgos alimentarios detectados (AESAN, 2009)

Las especies de *Bacillus* aparecen en ecosistemas muy diversos ya sean terrestres o marinos (Oguntoyinbo, 2007) y se aíslan frecuentemente tanto de alimentos crudos como en alimentos enlatados, pasteurizados o minimamente procesados. El efecto perjudicial que pueden provocar se puede minimizar e intentar controlar instaurando un enfriamiento inmediato y rápido de los alimentos cocinados o calentados, especialmente el arroz o productos ricos en almidón, y la posterior conservación de los mismos en refrigeración (Mossel y col., 2006). Las especies con más potencial alterante e incluso patógeno aisladas de alimentos son *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *Bacillus pumilus*.

La especie *B. cereus* está reconocida como agente causal de intoxicación alimentaria desde que fue identificada por Hauge en 1955 (Bourgeois, 1994). La capacidad de *B. cereus* para producir endosporas es muy frecuente en el medio natural y también en todo tipo de alimentos, tales como arroz, puré de patata, especias, leche, productos lácteos, verduras, carnes, pastas alimenticias, postres, etc. La leche descremada en polvo y la leche pasteurizada a veces se alteran por la presencia de estos microorganismos (se forman grumos) siendo necesaria su retirada del mercado. *B. cereus* puede producir dos tipos de enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética. Los síntomas de la toxiinfección tienen dos formas de presentación con presencia de diarrea o dolores abdominales y vómitos. Su período de incubación varía de 4 a 16 horas después de la ingesta del alimento contaminado. *B. cereus* también puede sobrevivir en algunas conservas (pescado en aceite, legumbres).

B. licheniformis, al igual que *B. cereus*, está asociada al deterioro de alimentos y a intoxicaciones alimentarias. Deteriora el pan, “pan filamentoso” (Sorokulova y col., 2003), pues provoca en el pan una textura pegajosa y fibrosa al principio de la contaminación y luego un fuerte olor, aunque son los productos lácteos los que tienen un mayor riesgo de

ser contaminados con la toxina producida por *B. licheniformis*, así como carnes cocidas, verduras, alimentos procesados, etc. Se asocia a *B. licheniformis* el desencadenamiento de gastroenteritis con síntomas como dolores de estómago, diarrea e incluso vómitos. La intoxicación por *B. licheniformis* también puede dar lugar a enfermedad entérica, septicemia, peritonitis, oftalmitis, etc., además de toxemia bovina y de abortos (Salkinoja-Salonen y col., 1999).

B. subtilis no es considerado tradicionalmente como un patógeno humano. Aunque raramente causa intoxicación alimentaria sí es el responsable del deterioro y alteración de muchos alimentos. Aún así existen algunas evidencias de su toxicidad como el brote surgido en una guardería por el consumo de leche en polvo contaminada con *B. subtilis* (Pavic y col., 2005). Sus esporas pueden sobrevivir a altas temperaturas, por lo que puede estar presente en alimentos pasteurizados y listos para el consumo. Al igual que *B. subtilis*, *B. pumilus* puede ser causante de contaminación alimentaria. Aunque no existen evidencia de patogenidad de esta especie, sí se puede producir alteración y degradación del alimento (Thompson y col., 1998).

1.2.4. Producción microbiológica de aminas biógenas. Histamina.

El deterioro de productos marinos puede ser el resultado de reacciones químicas o de algún tipo de daño físico que haya recibido el alimento durante su almacenamiento o transporte. No obstante la causa primaria de alteración es el crecimiento y metabolismo bacteriano. Durante el metabolismo bacteriano se forman sustancias volátiles como aminas, sulfuros, aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos, cuya acumulación en los productos marinos resulta en un olor indeseable e inaceptable. Además, la alteración microbiana puede implicar un oscurecimiento y la formación de exudados. Debido a que

un 25% de todos los alimentos producidos se pierden después de la cosecha por causa de actividad microbiana, este efecto adquiere una gran importancia global (Gram y Dalgaard, 2002).

Como sustrato las bacterias metabolizan compuestos nitrogenados no proteicos, como aminoácidos, pero también, en menor cantidad, carbohidratos, catalizando la transformación de lactato a acetato. Decisivo en el deterioro de los productos marinos es la reducción del óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (TMA). Esta sustancia es la causa del “olor a pescado” y representa un parámetro para determinar el grado de la alteración microbiana. Algunas especies de pescados poseen enzimas musculares que también son capaces de reducir el OTMA, pero en general la TMA es mayoritariamente de origen microbiano (Jay y col., 2005).

Las aminas biógenas son bases orgánicas no volátiles de bajo peso molecular y estructura alifática, aromática o heterocíclica. Estas moléculas, provistas de actividad biológica, están presentes en animales, plantas y microorganismos, donde desempeñan papeles importantes en muchas funciones fisiológicas o están involucradas en procesos de división celular, regulación de las funciones de ácidos nucleicos y de la síntesis proteica, y probablemente también en la estabilización de membranas (Smith, 1980).

Aminas biógenas como putrescina, cadaverina, histamina, espermidina, espermina, tiramina, agmatina y triptamina, se producen post-mortem en el pescado a través de la descarboxilación de aminoácidos libres específicos presentes en el músculo. Dichas aminas se pueden generar por la descarboxilación endógena de los aminoácidos, como resultado de una actividad metabólica normal, aunque mayoritariamente se forman por la descomposición exógena de los mismos a través de aminoácido-descarboxilasas que son producidas por la microbiota asociada al pescado (Rawles y col., 1996) como un mecanismo de defensa frente al medio ácido. (Eitenmiller y Desouza, 1984) indicaron que

la formación de aminas biógenas ocurre normalmente durante procesos de degradación que llevan implícitos mecanismos proteolíticos que dan lugar a la formación de aminoácidos libres, unido a la biosíntesis y secreción de descarboxilasas bacterianas. El contenido en aminas biógenas es una medida importante para conocer la calidad del pescado (Mackie, 1997), ya que en pescados recién capturados dichas aminas se encuentran en niveles muy bajos o no detectables.

Las aminas biógenas que se encuentran mayoritariamente en el músculo de pescado fresco son la espermina y espermidina (concentraciones inferiores a 10 ppm), pero en función de la especie de pescado, los aminoácidos presentes en sus tejidos y las condiciones de exposición a ciertas bacterias alterantes, se pueden generar otras aminas tales como histamina en pescados escómbridos [caballa (mackerel- *Scomber scombrus*), jurel (horse mackerel -*Trachurus trachurus*), atún (tuna- *Thunnus thynnus*), aguja azul o marlín azul (marlin- *Makaira nigricans*), pez espada (swordfish- *Xiphias gladius*), atun blanco o bonito del Norte (albacore- *Thunnus alalunga*), bonito (bonito- *Sarda sarda*), listado (skipjack tuna- *Euthynnus (Katsuwonus) pelamis*, y casi otras 100 especies] y no escombridos [eg, mahi-mahi (dolphin fish- *Coryphaena hippurus*), medregal (amberjack- *Seriola dumerili*), arenque (herring- *Clupea harengus*), sardina (sardine- *Sardina pilchardus*), anchoa (anchovy- *Engraulis* spp), pomatomo (bluefish- *Pomatomus saltatrix*)], en concentraciones superiores a 2000 ppm (Clifford y Walker, 1992). La histidina es el aminoácido precursor de la histamina.

Los productos marinos presentan un contenido relativamente alto en aminoácidos libres. Asimismo la actividad proteolítica de las enzimas bacterianas libera más aminoácidos, que son sustrato ideal para el metabolismo bacteriano, en el que se producen aminas biógenas. Además de las aminas biógenas se producen otros productos metabolitos microbianos derivados de aminoácidos, entre ellos, compuestos volátiles, como amoníaco,

ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos volátiles de azufre. Estos compuestos volátiles azufrados, que pueden ser detectados incluso en concentraciones de partes por billón (ppb), afectan notablemente al olor y sabor de los alimentos confiriéndoles un olor a podrido. Así, se forma sulfuro de hidrógeno (H_2S) procedente del aminoácido cisteína y la metionina se transforma en metil mercaptano (CH_3SH) y dimetilsulfuro [$(\text{CH}_3)_2\text{S}$]. Los olores extraños a frutas son debidos a los aminoácidos monocarboxílicos (Gram y Huss, 1996; Huss y col., 1995). Debido al aumento en la concentración de aminoácidos libres en el músculo y a unas condiciones favorables en el músculo (temperatura, pH...), se produce el crecimiento bacteriano y la acción enzimática derivada que degrada los aminoácidos provocando su descarboxilación, originando diferentes aminas biógenas que se acumulan en el pescado.

1.2.4.1 Histamina en alimentos de origen marino

El envenenamiento por histamina es una intoxicación de origen alimentario producida por el consumo de alimentos con niveles elevados de esta amina biógena. Este cuadro tóxico se asocia comúnmente con el consumo de escómbridos (atún, albacora, listado, bonito, bacoreta, caballa, etc.), pertenecientes algunos a las familias *Scombridae* y *Scomberesocidae* (Taylor, 1986), de ahí el nombre “envenenamiento o intoxicación por escómbridos” con el que le denomina frecuentemente. Sin embargo, puede ser debida al consumo de pescados no escómbridos, tales como anchoas, sardinas, arenques, etc., (Chen y col., 2008) o de otros alimentos tales como quesos, productos cárnicos, vino, etc. (Tenbrink y col., 1990). Los escómbridos se caracterizan por poseer niveles elevados de histidina libre en su tejido muscular (Taylor y col., 1989). Así, en un estudio llevado a cabo en Nueva Zelanda (Fletcher y col., 1995) se observó que tres especies marinas que habían sido implicadas en episodios de intoxicación histamínica: salmón de Nueva Zelanda

(*Arripis trutta*), kingfish (*Seriola grandis*) y atún blanco (*Thunnus alalunga*) poseían concentraciones de dicho aminoácido superiores a 1000 mg/100 g. Sin embargo, otras especies de pescado no escómbridos tales como la perca marina (Red rockcod- *Scorpaena cardinalis*) y el pargo colorado (Nannygai- *Trachichthodes affinis*), que nunca habían sido relacionados con intoxicaciones por histamina poseían unos niveles de histidina inferiores a 5 mg/100 g. Si se presentan condiciones favorables para el crecimiento bacteriano y para la biosíntesis del enzima histidín-decarboxilasa, la histidina puede ser descarboxilada a histamina (Figura 4).

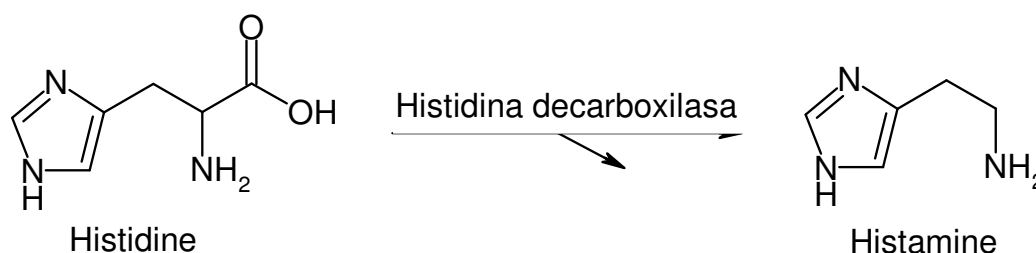


Figura 4. Descarboxilación de la Histidina

El nivel de histidina presente en el músculo del pescado no es siempre el mismo. Así por ejemplo el rodaballo y el besugo tienen niveles moderadamente elevados de histidina en sus tejidos musculares (0,30% y 0,36%, respectivamente), lo que pone de manifiesto el riesgo potencial de formación de histamina en estas especies cuando las bacterias productoras de histamina están presentes. A pesar de que la calidad microbiológica y bioquímica de estas especies durante el almacenamiento han sido previamente estudiadas (Alvarez y col., 2009; Rodriguez y col., 2003), sólo se ha publicado un estudio preliminar sobre bacterias productoras de histamina en besugo (Alvarez y col., 2009).

Por otra parte, es importante señalar que no siempre se ha encontrado una correlación entre el grado de deterioro del pescado y la concentración de histamina del mismo. De este modo, se ha observado que se pueden alcanzar niveles tóxicos de histamina antes de que el pescado esté degradado, es decir considerado como inaceptable al realizar un análisis organoléptico. Además, la histamina no posee color ni olor específicos que revelen su presencia en el pescado y resulta extremadamente estable, por lo que no puede ser eliminada durante los procesos tecnológicos empleados habitualmente en la transformación de los productos de la pesca, tales como esterilización, congelación, cocción, etc. Todo ello hace que la formación de histamina se convierta en un motivo de preocupación, tanto para los consumidores como para los elaboradores de productos de la pesca, de cara a garantizar la salubridad y seguridad de dichos alimentos.

1.2.4.2 Presencia de histamina en alimentos de origen marino

Se han encontrado niveles elevados de histamina en diversos tipos de pescado implicados en intoxicaciones histamínicas. La concentración de histamina en una lata de atún implicada en un episodio de intoxicación resultó ser de 116 mg/100 g de músculo, mientras que el de otro episodio causado por latas de atún fue de 2.74 mg/100 g (Kim, 1979). Los niveles de histamina en muestras de aguja azul (*M. nigricans*) implicadas en otro incidente fueron de 935-2.760 ppm, siendo las del mismo pescado fresco menores de 5 ppm y no causando éste los síntomas de la intoxicación (Morrow y col., 1991). En caballa ahumada en caliente asociada a un caso de intoxicación histamínica se encontraron 2.700 ppm de histamina, en comparación con las 25 ppm de histamina en caballa fresca ahumada del mismo modo (Clifford y col., 1989). En un muestreo llevado a cabo en atún, caballa y sardinas de buena calidad se encontraron cantidades de histamina menores de 0.5 mg/100 g (Fernandez Salguero y Mackie, 1987). El hecho de encontrar niveles elevados de histamina

en los pescados involucrados en cuadros de intoxicación junto con la excreción de niveles elevados de la misma en la orina de personas afectadas, parecen indicar que la histamina es la principal responsable de la intoxicación (Morrow y col., 1991).

1.2.4.3 Perspectiva legal

Desde un ámbito legal, sólo se han fijado límites tolerables para la histamina en pescados y en productos derivados. Así la Food and Drug Administration (EE.UU), propone como nivel máximo un valor medio de 50 mg/kg mientras que la Unión Europea establece un límite mayor (100 mg/kg). Ambas concentraciones de histamina son, sin embargo muy superiores a las habituales en pescado fresco. En bebidas alcohólicas fermentadas, si bien no existen disposiciones legislativas que limiten la presencia de histamina, diferentes expertos han recomendado no superar cifras de 2-10 mg/l., variando esta concentración en función del país. Pescado y vino no son los únicos alimentos que pueden contener histamina. De hecho, se han descrito cantidades semejantes o superiores en otros alimentos, como quesos o derivados cárnicos crudos curados y, sorprendentemente, no se han señalado límites máximos tolerables para ellos hasta el momento (Salas, 2008).

1.2.4.4 Formación de histamina

Cuando el pescado, tras su captura, es sometido a temperaturas elevadas se puede favorecer la formación de histamina, pero el nivel de acumulación de esta toxina también se ve influenciado por el tiempo de exposición a las temperaturas de abuso. Diversos estudios, llevados a cabo tanto en pescados como en caldos de cultivo enriquecidos con histidina, indican que la formación de histamina es mayor en el rango de temperaturas comprendido entre 20 y 40°C (Arnold y col., 1980; Eitenmiller y col., 1981; Niven y col.,

1981). Estos autores indicaron que la bacteria más frecuentemente involucrada en la producción de histamina, *Morganella. morganii*, crece rápidamente a temperaturas comprendidas entre 20-25°C, pero no lo hace a temperaturas inferiores. Cuando *M. morganii*, *Klebsiella. oxytoca*, *Serratia marcescens* y *Plesiomonas shigelloides* fueron inoculadas en músculo de atún e incubadas a 20°C, solamente *M. morganii* y *K. oxytoca* producían histamina en niveles detectables: 15 y 14.3 mg/100 g, respectivamente, tras 18 h. Cuando se incubó a 8°C, dichas bacterias producían menor cantidad de histamina: 4.3 y 2.8 mg/100 g, respectivamente, al cabo de 84 h. Sin embargo, no producían histamina al incubar a 0°C (Lopez Sabater y col., 1994).

Una vez biosintetizada y secretada la enzima histidín-descarboxilasa al medio extracelular, puede seguir actuando en el pescado aunque las bacterias productoras de histamina estén inactivas. Debe destacarse que la enzima puede presentar actividad a temperaturas de refrigeración o próximas a éstas. Por otra parte, la histidín-descarboxilasa es más estable que las bacterias durante la congelación y puede ser reactivada rápidamente tras la descongelación del pescado. (Fuji y col., 1994) encontraron que tras 7 días de almacenamiento a -20°C, las bacterias halófilas productoras de histamina, *Photobacterium. phosphoreum* y *Photobacterium histaminum*, mantenían un 27-53% de su actividad histidín-descarboxilasa. Sin embargo, el recuento de células viables había sufrido una reducción de exponente seis con respecto al recuento inicial.

Tanto la enzima como las bacterias que lo producen pueden inactivarse durante el cocinado. Sin embargo, una vez formada la toxina no puede ser eliminada por el calor (ni siquiera mediante la esterilización), ni por la congelación. Así, cuando se prepararon derivados de pescado a partir de mahi-mahi que contenía 343-363 mg/100 g de histamina y se sometieron a horneado o cocción, se observó que los niveles de histamina tras dichos tratamientos eran de 303-397 mg/100 g (Baranowski y col., 1990). Ésto indica que el

cocinado no provoca la disminución del contenido de histamina en alimentos preparados. Tampoco es fácil reducir el contenido en histidina, precursor de la histamina de los alimentos en que abunda. Así, (Perez Martin y col., 1988) encontraron que el contenido de histidina libre en bonito del norte era reducido en un 2.2% tras un cocinado normal y entre el 6.5 y 13.8% tras esterilización a 115 °C durante 60 min. No obstante, para que se produzcan cantidades adicionales de histamina en un alimento tras ser cocinado es necesario que se recontamine con bacterias productoras de histamina. Por otra parte, el almacenamiento en congelación durante períodos largos de tiempo (en torno a 6 meses) puede llegar a inactivar las bacterias productoras de histamina. Por estos motivos, los niveles elevados de histamina se producen más frecuentemente en pescados crudos no congelados (FDA, 1996).

Las bacterias productoras de histamina fueron clasificadas por (Behling y Taylor, 1982) en dos grupos: (1) aquellas denominadas productoras fuertes y capaces de producir grandes cantidades de histamina en caldo de infusión de atún (100 mg/100 ml) durante un corto período de incubación (24 h) a temperaturas superiores a 15 °C, y (2) las denominadas productoras débiles, que producían cantidades menores (25 mg/100 ml) tras incubación prolongada (48 h) a temperaturas mayores o iguales que 30 °C. Basándose en el tiempo y temperatura a los que se produce histamina, *M. morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter aerogenes* fueron consideradas como productores prolíficos, mientras que otras bacterias como *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli*, eran productoras débiles (Behling y Taylor, 1982).

1.2.4.5 Bacterias productoras de histamina

La composición de la microbiota del pescado está influenciada por el ambiente de la zona de captura, la época del año y las condiciones de pesca, manipulación y procesado.

La temperatura es el factor ambiental más importante de los que influyen en el número inicial y tipos bacterianos en la superficie del pescado. Las poblaciones bacterianas típicas de los pescados de aguas templadas son fundamentalmente las psicrotófas que viven en aguas de temperaturas inferiores a 10 °C. Sin embargo, la temperatura del agua superficial puede aumentar si se prolonga el tiempo cálido, con lo que las especies pelágicas de pescado (por ejemplo el jurel, la caballa o el arenque) pueden ver aumentada su carga bacteriana superficial mesófila (Gram y col., 1989)

Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos. Las bacterias de la piel y agallas son predominantemente las aerobias facultativas, especialmente *Vibrio*, que también se han aislado en gran número en los peces pelágicos. Las bacterias anaerobias obligadas son poco frecuentes en la superficie del pescado pero se presentan en gran número en el intestino. Liston (Liston, 1980) establece como rango normal 10^2 – 10^7 UFC (unidades formadoras de colonias)/cm² en la superficie de la piel. Las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 UFC/g (Shewan, 1962). Fue también Shewan quién concluyó que la microbiota depende más del medio ambiente de captura que de la especie (Shewan, 1977).

La microbiota responsable de la alteración del pescado consta de bacilos psicrofílos Gram negativos, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Shewanella* y *Flavobacterium* (Huss, 1998). Dado su carácter psicrofílo, son capaces de crecer bien entre 0 y +1 °C, pero hay un gran número de especies de *Pseudomonas* que son capaces de alterar el pescado a –3 °C, aunque a una velocidad lenta (Shaw y Shewan, 1968).

A lo largo de los años, diversos autores han descrito especies bacterianas productoras de histamina aisladas de pescado, tales como: *Aeromonas hydrophila* en

caballa (Middlebrooks y col., 1988), *Staphylococcus xylosus* en semiconservas de anchoas (Rodríguez Jerez y col., 1994), *M. morganii*, *H. alvei* y *K. pneumoniae* en atún congelado (Taylor y Speckhard, 1983). *E. aerogenes* (Taylor, 1986), *Raoultella planticola* (Taylor y col., 1979), *P. damsela* (antes llamado *P. histaminum*) (Okuzumi y col., 1994) y *Photobacterium phosphoreum* en caballa (Morii y col., 1988). También *C. freundii*, *E. cloacae*, *P. vulgaris* y *P. mirabilis*, aislados de diferentes tipos de pescado, se identificaron como productoras de histamina (Kim y col., 2003). Sin embargo *Stenotrophomonas Maltophilia*, que es un débil formador de histamina, posee una doble actividad en el deterioro del pescado: por un lado es altamente proteolítica y por otra parte es fuertemente productora de cadaverina (Ben-Gigirey y col., 2002).

1.2.5. *Streptococcus parauberis*

El género *Streptococcus* está constituido por bacterias Gram-positivas y catalasa negativas con forma de coco, no móviles y agrupadas en cadenas. Se encuentran dentro del grupo de las “bacterias ácido lácticas” pues producen ácido láctico durante la fermentación de los carbohidratos. Los estreptococos se clasifican serológicamente, en base a los precipitados que producen, en los denominados grupos Lancefield. Así, en esta clasificación se pueden encontrar las distintas especies que producen enfermedades en el ser humano. En el grupo A se encuentra *Streptococcus pyogenes*, que es el responsable de faringoamigdalitis, escarlatina, piodermitis, septicemias, endocarditis y síndrome del shock tóxico. Los estreptococos beta hemolíticos de los grupos C y G (*Streptococcus equi* y *Streptococcus carii*) producen endocarditis. Los β hemolíticos del grupo B (*Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*) son muy importantes como agentes etiológicos de mastitis en vacas, aunque también pueden producir sepsis y meningitis neonatal. El gamma hemolítico del grupo D (*Streptococcus faecalis*) produce endocarditis, sepsis, meningitis e

infección urinaria. Igualmente, el α hemolítico (*Streptococcus viridans*) de los grupos K y H (*Streptococcus salivarias*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*) produce endocarditis, y *Streptococcus mutans* caries dental.

Streptococcus uberis está considerado un patógeno ambiental causante de una gran parte de las mastitis o inflamaciones de la glándula mamaria que afectan sobre todo al ganado vacuno y por consiguiente influye en la calidad de la leche, produciendo así importantes pérdidas económicas en los productores y en la industria lechera. Dentro de esta especie se han diferenciado dos tipos: *S. uberis* propiamente dicho y *S. uberis* tipo II o *Streptococcus parauberis* (Williams y Collins, 1990). *S. parauberis*, además de ser aislado en muestras de leche procedentes de vacas con mastitis, también se conoce por ser el causante de estreptococosis en peces, una infección que se produce en ciertos pescados de acuicultura como lenguado (Nho y col., 2009) o rodaballo (Domenech y col., 1996).

Aunque *S. parauberis* no es un patógeno humano sino una especie bacteriana relacionada con enfermedades en otros animales, recientemente se ha aislado de ciertos productos cárnicos alterados envasados en atmósfera modificada (Koort y col., 2006), junto con otras bacterias lácticas de productos acuáticos y cárnicos (Najjari y col., 2008), y más recientemente de un producto artesanal tipo jamón cocido y envasado en atmósfera modificada (Vasilopoulos y col., 2010). Tanto el envasado a vacío como el envasado en atmósfera modificada generalmente se combinan con refrigeración y otras técnicas de procesamiento que no conllevan tratamientos térmicos o estos son muy débiles con el fin de comercializar los productos con unas mejores propiedades organolépticas (Phillips, 1996), por lo que en muchos de estos productos sigue existiendo riesgo microbiológico, asociado a la posible presencia de este microorganismo.

1.3. Detección e identificación bacterianas en alimentos de origen marino

1.3.1. Métodos clásicos

El estudio de la alteración microbiana post-mortem de los alimentos de origen marino se ha basado tradicionalmente, por una parte, en el aislamiento e identificación microbianos mediante técnicas clásicas de cultivo tradicional y por otra parte, en la medida de metabolitos como TMA, H₂S, aminas biógenas, bases volátiles, etc. Los métodos clásicos sirven para la determinación del contenido total bacteriano o la detección de la presencia de un patógeno particular. En medios selectivos pueden ser identificadas y seleccionados ciertos géneros y especies mediante sus propiedades fenotípicas, morfológicas y bioquímicas. La identificación fenotípica se basa en la comparación directa de características fenotípicas de bacterias desconocidas con cultivos tipo, en donde la capacidad de identificación es directamente proporcional al número de características similares. Cuando se clasifican e identifican microorganismos por métodos tradicionales se tienen en cuenta todas las características analizadas, pero son algunas de esas características las que realmente permiten hacer una primera identificación, tales como la morfología (tinción Gram), crecimiento en presencia o ausencia de aire, crecimiento en determinados tipos de medios, pruebas de catalasa u oxidasa (Duerden y col.,1998). Después se emplean otras técnicas para una mejor aproximación a la identificación bacteriana como la observación a microscopio o a nivel macroscópico: morfología de la colonia, tipo de hemólisis, requerimientos de crecimiento o otros test bioquímicos como hidrólisis del piruvato, aminopeptidasa, ureasa, indol, oxido-fermentación, prueba de la coagulasa etc. Para hacer más rápidos estos tests existen en el mercado sistemas o galerías multipuebas, donde se lleva a cabo inoculación, incubación y lectura. Con estos tests es

posible clasificar microorganismos a nivel de género e incluso a nivel de la especie a la que probablemente pertenecen. Sin embargo los métodos de identificación bacteriana convencionales requieren tiempos largos y la identificación está limitada por pruebas que muchas veces no permiten una identificación fiable.

Hoy en día, la detección e identificación precoz de microorganismos patógenos y alterantes en cualquier alimento, y en productos marinos en concreto, es de gran importancia para determinar el riesgo microbiológico y asegurar la calidad de dichos alimentos. Para una detección rápida y predicción de la estabilidad de productos alimentarios durante el almacenamiento es necesario identificar las especies bacterianas, que alteran la calidad o que son patógenas. Es por ello que en los últimos tiempos se ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de métodos sensibles y rápidos de detección e identificación microbianas (Barros Velazquez y col., 2002). Así, en los últimos años el diagnóstico molecular ha experimentado una importancia creciente en la detección rápida e identificación de microorganismos patógenos y específicamente alterantes en el ámbito alimentario en general, y en el de los productos marinos, en particular.

En relación a la investigación de bacterias productoras de aminas biógenas, diversos autores han aplicado métodos microbiológicos, bioquímicos, enzimáticos, cromatográficos o genéticos en su estudio. Así, se han descrito diferentes métodos para el análisis y determinación del contenido en aminas biógenas de los alimentos (HPLC, etc). Sin embargo estos métodos sirven en el mejor de los casos para conocer la concentración de las aminas en cuestión, sin que sea ya posible intervenir para evitar su presencia en el alimento. Sólo los métodos microbiológicos permiten detectar precozmente la presencia de bacterias productoras de aminas biógenas y, como consecuencia, la posibilidad de evitar su desarrollo y la formación de aminas biógenas.

Se han descrito medios de cultivo especiales para la detección de bacterias productoras de aminas biógenas. Se trata de medios suplementados con el correspondiente aminoácido precursor de la amina y un indicador de pH. Cuando se descarboxila el aminoácido y se genera la amina correspondiente, se produce una alcalinización del medio, lo que da lugar a un viraje del indicador de pH y por consiguiente, permite una rápida detección visual. Sin embargo, algunas bacterias originan una excesiva producción de ácido que neutraliza la alcalinización producida por la síntesis de la amina, lo que da lugar a falsos negativos en un número considerable de casos. Así, el medio de Niven contiene histidina entre sus componentes y se ha utilizado desde su desarrollo para aislar bacterias productoras de histamina (Niven y col., 1981). (Yoshinaga y Frank, 1982) modificaron la composición y el pH del medio de Niven, para que también creciesen bacterias sensibles al ácido. (Choudhury y col., 1990) diseñaron un medio que detectaba la descarboxilación. El mayor inconveniente de estos medios es que pueden dar falsos positivos debido a la formación de otros compuestos alcalinos; aunque realmente sí son muy útiles para realizar un primer cribado de cepas que poseen actividad aminoácido descarboxilasa. Posteriormente, las cepas aisladas como potencialmente productoras de histamina se pueden identificar mediante diferentes pruebas bioquímicas o tests fenotípicos. La potencial producción de histamina se puede confirmar con diversas técnicas analíticas: cromatografía (HPLC, en capa fina), fluorimetría, electroforesis capilar, etc.

1.3.2. Métodos genómicos

Los métodos de identificación de especies bacterianas basados en el análisis del ADN se pueden clasificar principalmente en dos grupos: métodos que requieren la hibridación del ADN y métodos basados en la amplificación del ADN. Los métodos de hibridación se basan en la detección del anillamiento de dos moléculas de ADN

monocatenarias (ssADN) muy similares o incluso idénticas. Una sonda de ADN monocatenario previamente marcada, se combinará con una molécula diana de ADN complementaria, en caso de estar presente en el extracto preparado a partir del producto marino. La molécula de ADN utilizada como sonda ha de ser característica de la especie bacteriana cuya presencia en el producto alimentario se está investigando. De forma alternativa, se pueden utilizar sondas de ADN frente a moléculas de ADN diana menos específicas, comunes para un grupo de bacterias. De entre este grupo de métodos, los ensayos de hibridación dot-blot tienen aplicaciones destacables para identificar bacterias en productos de origen marino. Tal es el caso de la detección precoz mediante hibridación ADN/ADN dot-blot reversa de *H. alvei*, *E. aerogenes* y *S. maltophilia*, como principales responsables de la formación de aminas biógenas en túnidos (Ben-Gigirey y col., 2002).

Sin embargo, son los métodos basados en la amplificación del ADN los preferidos a la hora de realizar este tipo de análisis, ya que los ensayos basados en la hibridación del ADN son especialmente tediosos. Se amplifica por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) específicamente un fragmento de ADN diana bien definido, cuyos extremos presentan una secuencia perfectamente conocida. En este caso los productos de amplificación obtenidos pueden ser posteriormente analizados mediante distintos métodos, tales como, análisis de restricción (RFLP), secuenciación, etc. Este método puede ser aplicado a la detección simultánea de la presencia de más de una especie bacteriana. La detección de los productos de amplificación y de sus productos de restricción se lleva a cabo directamente mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa o de poliacrilamida.

La técnica de la PCR consiste en calentar una solución que contiene el molde bicatenario, de modo que se desnaturalice para dar lugar a ADN monocatenario. A

continuación, se rebaja la temperatura para que los cebadores se unan a los extremos de las cadenas simples (anillamiento). Posteriormente se sube la temperatura para que la polimerasa se active, sintetice una nueva hebra, y cada cadena simple constituya una cadena doble, finalizado lo cual se vuelve a subir la temperatura para que el ADN bicatenario recién constituido se desnaturalice, generando ADN monocatenario, reiniciando el ciclo. La técnica de la PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha (Wolf y col., 1999) (Ciriza y col., 2001). Es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ADN. Es una forma muy simple y muy rápida de multiplicar el ADN molde presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN, hasta hacer posible su detección mediante una simple electroforesis submarina horizontal en gel de agarosa. En poco tiempo, esta técnica ha conseguido ser ampliamente utilizada, no sólo en el campo de la genética molecular, sino en otras muchas ciencias, tal es el caso de la ciencia y tecnología de los alimentos (Matsunaga y col., 1999).

El inventor de esta interesante técnica fue Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. Utilizó la PCR para la amplificación del gen de la β -globina humana (Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona, 1987) y el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki y col., 1985). Desde entonces la PCR ha revolucionado todos los campos en los que se contempla el estudio y manipulación de los ácidos nucleicos.

El ADN, a diferencia de otros materiales biológicos como las proteínas o el ARN, no se degrada cuando los alimentos son sometidos a tratamientos físicos, químicos, térmicos o a altas presiones, procesos habituales en las industrias agroalimentarias. Así se puede analizar ADN incluso en muestras altamente procesadas y/o degradadas. Mullis se basó en la replicación de ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN

polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados cebadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Así, mediante la amplificación del ADN se consigue aumentar de forma exponencial la cantidad inicial de ADN (Figura 5), gracias a la repetición cíclica de una serie de pasos (desnaturalización, anillamiento y elongación o extensión) en los que se combinan tiempos y temperaturas. El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos podemos optimizar la reacción.

El proceso se lleva a cabo en un termociclador (Figura 6), un equipo que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programados de forma exacta.

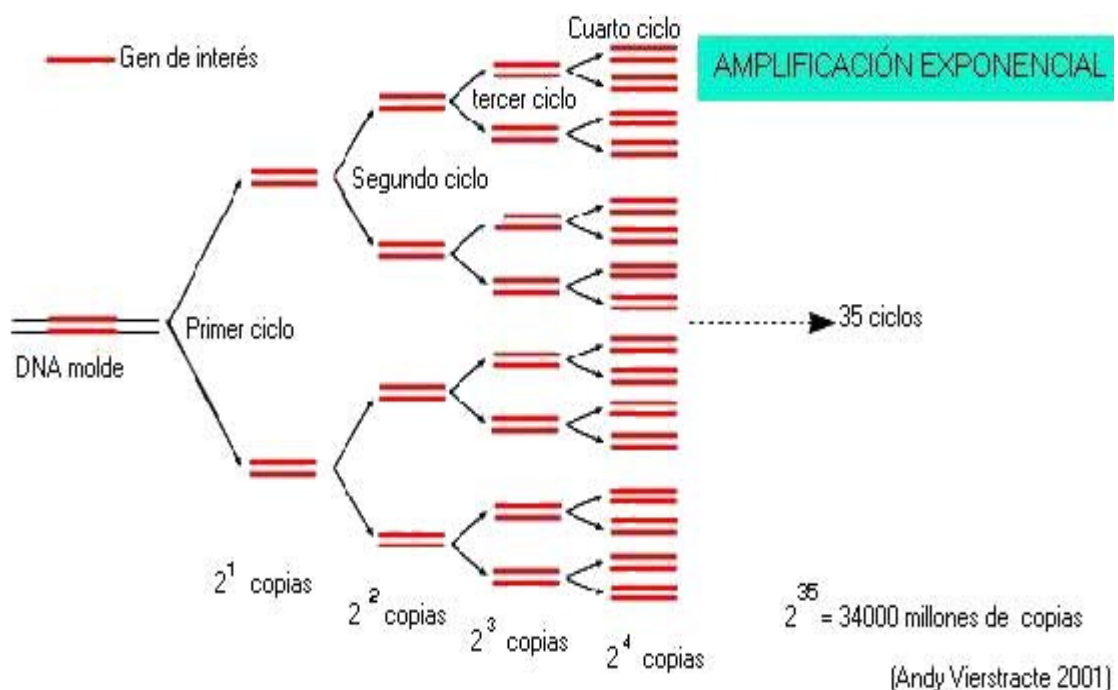


Figura: 5. Amplificación exponencial de la PCR.



Figura 6: Termocicladores convencionales y de gradiente

La detección de los productos de la PCR se realiza normalmente mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 7).

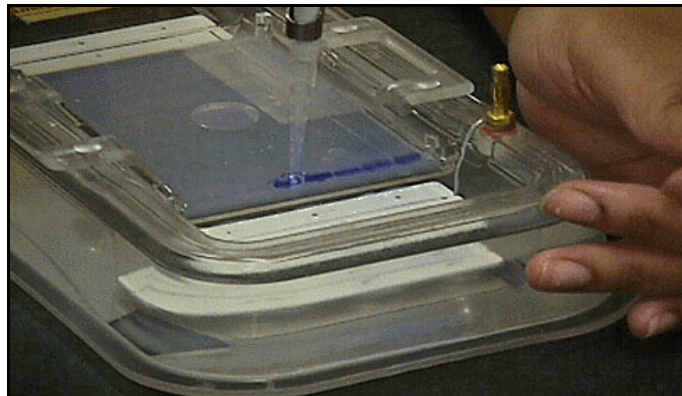


Figura 7: Preparación de la electroforesis de agarosa.

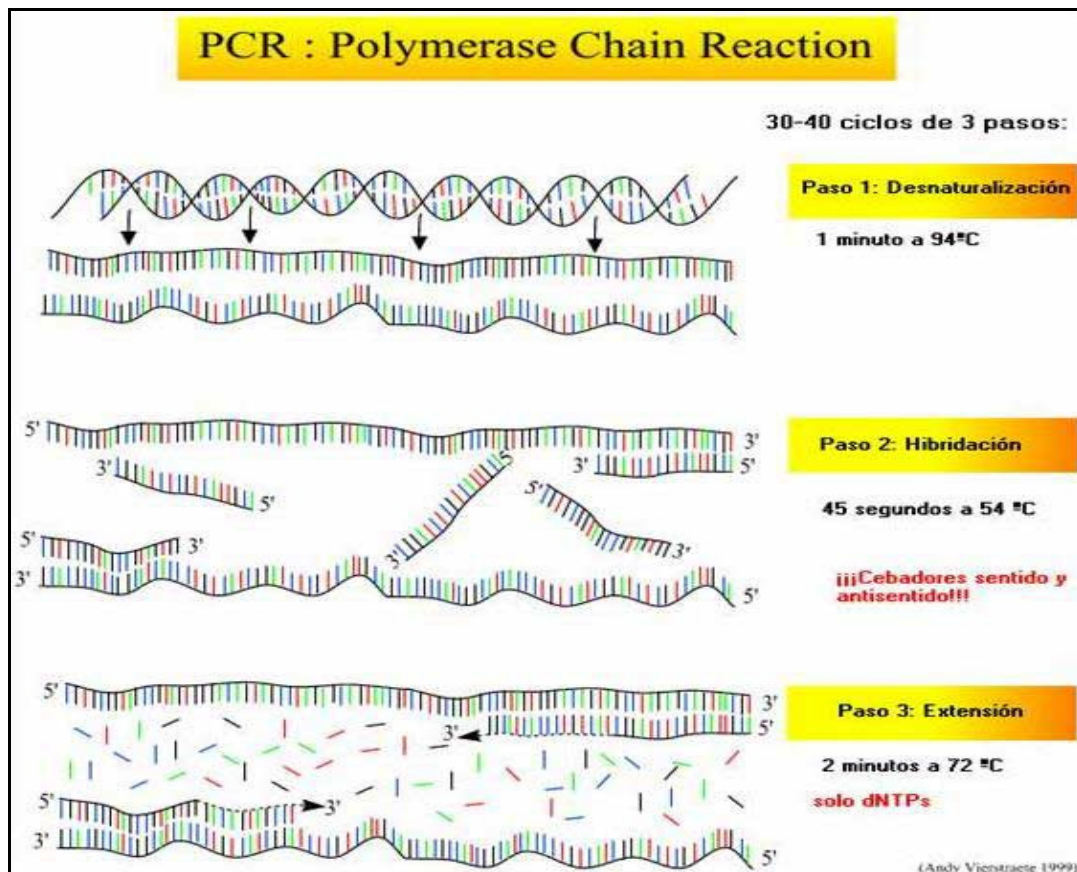


Figura 8: Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.

En la Figura 8 se puede apreciar de forma detallada las tres etapas que componen cada ciclo de la PCR.

En la reacción de PCR intervienen como componentes de la reacción: el ADN molde bicatenario, los cebadores, los nucleótidos y la ADN-polimerasa. En el caso concreto de los productos de la pesca se han puesto a punto métodos moleculares de identificación rápida y precoz de bacterias patógenas y alterantes, mediante PCR dirigida al 16S ADN_r (Romero y Navarrete, 2006), como por ejemplo, la detección de *M. morganii* en concentraciones inferiores a 10 UFC/g, principal responsable de la intoxicación histamínica en túnidos (Kim y col., 2003).

La secuencia nucleotídica del gen 16S ADN_r se ha investigado en un gran número de especies, pero otras zonas del ARN también se están considerando para la identificación bacteriana. Tal es el caso de los genes 23S, la zona entre el gen 16S-23S (ITS, Intergenic space regions) u otros como *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) y *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa).

Recientemente se ha introducido la RTi-PCR (PCR en Tiempo Real) para la detección y cuantificación de las principales bacterias causantes de intoxicaciones alimentarias. Su principal característica es que permite no sólo detectar sino también cuantificar la cantidad de ADN de una determinada bacteria o grupo de bacterias que se pretenden identificar. Así, un gran número de procedimientos de RTi-PCR se han desarrollado con este fin para *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* o *Leuconostoc mesenteroides* (Alarcon y col., 2006; Elizaquivel y col., 2008; Hein y col., 2001; Malorny y col., 2004; Nogva y col., 2000).

1.3.2.1. Métodos genómicos en la identificación de *Bacillus*

En el caso de la detección e identificación de *Bacillus* spp. también se emplean técnicas basadas en el uso de la PCR para su identificación basada en el gen 16S ADN_r (Wattiau y col., 2001) y también se combina con el análisis con enzimas de restricción (Wu y col., 2006). En algunos casos como en la diferenciación de *B. cereus* de *B. thuringiensis* (Chen y Tsen, 2002; Priest y col., 1994) y en el caso de *B. subtilis* de *B. amyloliquefaciens* (Wang y col., 2007) surge la dificultad de diferenciar esas especies entre sí, debido a la similitud de las secuencias nucleotídicas en el gen 16S ADN_r. Esto ha provocado una atención creciente hacia otras secuencias genéticas como el gen *rpoB* (Wu y col., 2006). Por otra parte se han desarrollado otros métodos basados en la PCR en tiempo real, en concreto

sondas TaqMan para el gen 16S ADNr para detectar y cuantificar bacterias del grupo *B. cereus* (Martinez-Blanch y col., 2009; Reekmans y col., 2009).

1.3.2.2. Métodos genómicos para la identificación de bacterias productoras de histamina

A las dificultades inherentes a la detección de cepas productoras de aminas biógenas en medio de cultivo se une su lentitud. Todo ello ha conducido a la introducción de técnicas rápidas de biología molecular basadas en la hibridación del ADN (Ben-Gigirey y col., 2002) y especialmente la PCR para la detección e identificación de bacterias productoras de aminas biógenas (Kim y col., 2003). La rapidez y sensibilidad de la PCR para la identificación de microorganismos (aplicable también a bacterias productoras de histamina) es importante para prevenir la acumulación de esta amina biógena en alimentos. Diferentes oligonucleótidos cebadores han sido descritos para detectar los genes que codifican para histidín descarboxilasa en este grupo de microorganismos (Marcobal y col., 2006).

Otras técnicas que se han desarrollado en los últimos años, tales como Real-Time PCR, complementan a la PCR convencional permitiendo la cuantificación. Así, esta técnica añadida permite detectar y cuantificar directamente las bacterias productoras de histamina aisladas de pescado, por lo que se puede reducir sensiblemente el tiempo de detección de dicha microbiota y determinar sus niveles en el alimento (Fernandez y col., 2006).

Sin embargo, las técnicas moleculares tienen algunas limitaciones pues se necesita alguna información a priori de la secuencia, la replicación del ADN puede estar inhibida por varios componentes presentes en el extracto, pueden aparecer falsos negativos debido a

mutaciones que impiden la unión de uno o ambos primers, o incluso falsos positivos por contaminación de las muestras.

1.3.2.3. Métodos genómicos en la identificación de *Streptococcus parauberis*

En el caso de la identificación de estreptococos, se han propuesto herramientas moleculares como el ribotipado y el análisis de secuencias de otros genes diana (Schlegel y col., 2003). Aunque fenotípicamente no se pueden distinguir, la diferenciación entre *S. parauberis* frente a *S. uberis* se consigue mediante la secuenciación del gen 16S rADN (Williams y Collins, 1990).

Más recientemente los microarrays de ADN están siendo una herramienta común en muchas áreas de la investigación microbiana tanto en el campo del diagnóstico clínico como en el sector alimentario (Mohania y col., 2008) (Neethirajan y Jayas, 2011). Esta técnica novedosa, permite hibridar múltiples muestras de ADN simultáneamente, lo que abre el camino para el cribado de un número muy amplio de cepas y especies microbianas patógenas y alterantes en alimentos.

1.3.3. Métodos proteómicos

En los últimos años se han desarrollado una variedad de métodos de identificación basados en el análisis de proteínas para la identificación de especies bacterianas tanto en el área de medicina como en productos alimentarios.

Así, las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. En la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se conjugan el anticuerpo específico con una enzima que, en presencia del sustrato adecuado, genera color, lo que permite detectar y cuantificar el antígeno. Estos métodos se utilizan para identificar bacterias patógenas como

Salmonella, *Escherichia* y *Listeria*, entre otras (Jay y col., 2005).

Recientemente, se han venido utilizando nuevas metodologías basadas en el análisis de proteínas. Tal es el caso de la espectrometría de masas. Estas técnicas incluyen la identificación de péptidos obtenidos por la digestión de las proteínas, utilizando espectrometría de masas, así como la secuenciación de Novo utilizando espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En el caso concreto de la identificación bacteriana, se ha estudiado el proteoma de diversas bacterias y se han definido biomarcadores al nivel de género, de especie o incluso de cepa (Holland y col., 1999; Demirev y col., 2004; Fagerquist y col., 2005; Russell, 2009).

En otros estudios se ha puesto a punto la identificación de especies bacterianas por espectrometría de masas utilizando el perfil de masas de proteínas extraíbles de bajo peso molecular (menores de 15,000 Da), optimizando diversas metodologías de extracción (Mazzeo y col., 2006). A este efecto se utiliza un espectrómetro de masas con fuente de ionización de MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz), que produce, con gran sensibilidad, iones de péptidos y proteínas con carga 1+, siendo, por tanto, directo el cálculo del peso molecular

1.3.3.1. Análisis MALDI-TOF

La técnica Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ha sido presentada como un método rápido y simple para la diferenciación bacteriana, debido a su rapidez, coste reducido y la sencillez en la preparación de la muestra, en comparación con las técnicas tradicionales (Seng y col., 2009; van Baar, 2000).

El procedimiento para la identificación bacteriana por MALDI-TOF MS en alimentos consta de varias etapas. Primero se lleva a cabo la preparación de la muestra;

en ella las bacterias se aíslan de los alimentos y se cultivan con el fin de obtener cultivos puros y colonias aisladas. Posteriormente las células bacterianas son lisadas mediante un solvente orgánico y un ácido fuerte, siendo ACN (acetonitrilo) y TFA (ácido trifluoroacético) los más frecuentemente utilizados. Tras centrifugar, una porción del sobrenadante se mezcla con la matriz orgánica, habitualmente ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. La mezcla matriz-muestra se deposita en una superficie de acero (Figura 9) de tal forma que ambas cristalizan conjuntamente cuando se evapora el solvente. La mezcla es irradiada entonces con un láser (radiación UV de 337 nm), lo que provoca que la matriz absorba dicha energía y se la transfiera a la muestra provocando su ionización. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la deserción de los iones de fase sólida a fase gaseosa. La muestra ionizada y vaporizada crea una densa nube de gas entre los electrodos. El campo eléctrico aplicado se emplea para acelerar la muestra hasta el detector. Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, se desplazan más rápidamente y son detectados en primer lugar. Como consecuencia de este proceso, el detector genera el perfil o huella química específica de esa muestra.

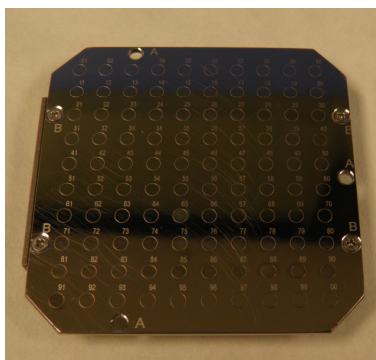


Figura 9: Placa de acero inoxidable utilizada en el análisis MALDI-TOF

La figura 10 representa un esquema de dicha técnica.

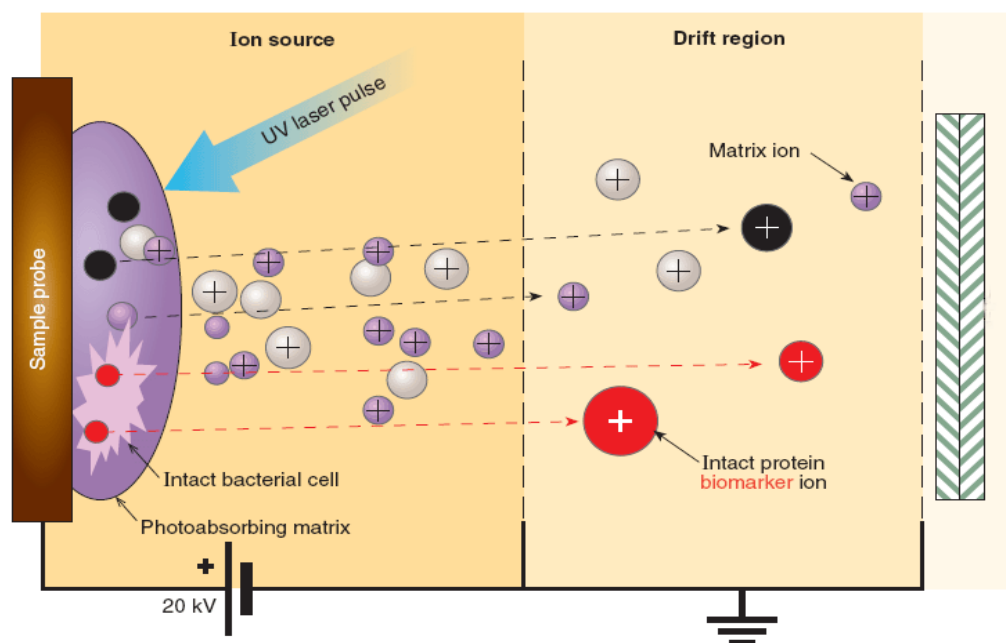


Figura 10: Esquema de la técnica MALDI-TOF MS

Una vez obtenidos los perfiles espectrales para cada cepa bacteriana (ver un ejemplo en la Figura 11), se procede al análisis de todos los resultados obtenidos. Los espectros se procesan con el programa Data Explorer (Applied Biosystems) y las listas de masas obtenidas para cada muestra se procesan con la aplicación SPECLUST (<http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html>) (Alm y col., 2006)

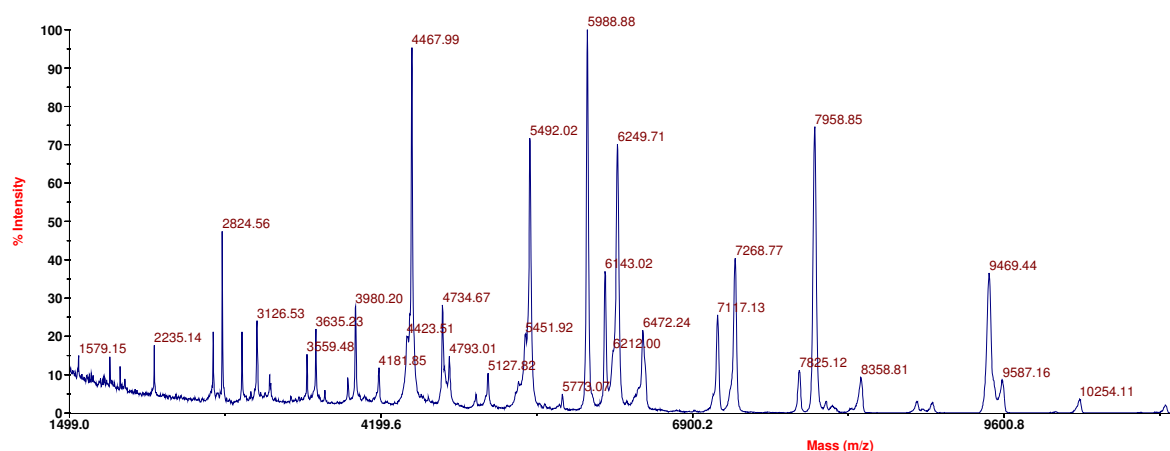


Figura 11: Ejemplo espectro de *P. mirabilis* obtenido tras el análisis MALDI-TOF

Los perfiles espectrales obtenidos mediante MALDI-TOF MS son altamente selectivos para cada especie bacteriana, produciendo fingerprints específicos que permiten la diferenciación de los microorganismos en géneros, especies e incluso cepas (Bright y col., 2002). La identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS se basa en la comparación de espectros de cepas desconocidas con una librería de cepas de referencia. Muchos trabajos se han centrado en la creación de bases de datos espectrales para un amplio número de cepas bacterianas (Dare, 2006; Erhard y col., 2008). Sin embargo, el reto fundamental de esta técnica consiste en mejorar la actual limitada disponibilidad de perfiles microbianos en bases de datos de referencia. Además, la mayoría de estudios de diferenciación microbiana por MALDI-TOF MS están dirigidos al diagnóstico clínico de cepas bacterianas asociadas con enfermedades humanas, existiendo pocos trabajos en el campo de la microbiología de los alimentos (Mazzeo y col., 2006).

Para llevar a cabo el análisis de los espectros no se necesita identificar las proteínas, sino que lo relevante es la presencia o ausencia de algunos picos específicos y, puesto que cada muestra puede exhibir un patrón específico de picos, el resultado, muy frecuentemente, es la obtención de un perfil especie-específico para cada cepa bacteriana.

En los últimos años, diversos estudios han demostrado la viabilidad del uso de MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos (Sauer y col., 2008; Freiwald y Sauer, 2009; Seng y col., 2009; Welker, 2011). Así, la detección y la comparación de los patrones de masas proteicas se ha convertido en una herramienta útil para la identificación rápida de bacterias, debido a la alta especificidad de los perfiles de masa obtenidos. Estudios recientes en el ámbito alimentario se han aplicado

a patógenos transmitidos por los alimentos. Estos trabajos han abordado la clasificación e identificación de un amplio rango de patógenos que causan intoxicaciones alimentarias, como *Aeromonas hydrophila*, *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* spp., *Cronobacter* spp. o *Bacillus* spp (Dieckmann y col., 2005; Donohue y col., 2006; Carbonnelle y col., 2007; Lasch y col., 2009; Dubois y col., 2010; Kiehntopf y col., 2011). En otros estudios recientes desarrollados en nuestro laboratorio se ha creado una base de datos de espectros con las principales especies bacterianas patógenas y alterantes en pescado y productos a base de pescado (Böhme y col., 2010a; Böhme y col., 2010b). Estos estudios han incluido géneros como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* y diversos géneros de la familia Enterobacteriaceae. Estos estudios abren el camino hacia el diagnóstico precoz mediante proteómica de las principales especies microbianas patógenas o alterantes en productos de la pesca y acuicultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo central el desarrollo de técnicas moleculares, basadas en la genómica y en la proteómica, para la identificación rápida de microorganismos patógenos y alterantes en productos de la pesca frescos y elaborados. Para ello se han considerado algunas de las especies microbianas de mayor relevancia en este ámbito, al ser potencialmente comprometedoras de la seguridad alimentaria. Como dianas moleculares se han considerado el gen 16S ADNr, el cual ha sido sometido a amplificación, secuenciación y análisis filogenético, así como la fracción del proteoma intracelular inferior a 15 kDa. Ambas estrategias, basadas en el análisis genético y proteómico, se combinan en este estudio con el fin de evaluar sus ventajas, limitaciones y complementariedad. Asimismo el análisis filogenético se ha utilizado como herramienta de apoyo para el desarrollo de técnicas proteómicas alternativas a los métodos genéticos para el diagnóstico precoz de especies patógenas y alterantes en productos de la pesca y acuicultura

2.2. Objetivos específicos

- I. Identificar y caracterizar por vez primera las principales bacterias productoras de histamina aisladas de dos especies acuícolas de alto valor comercial: rodaballo y besugo de acuicultura. Para ello se recurrirá a la PCR y secuenciación, procediendo asimismo a la definición de biomarcadores proteicos para su identificación rápida mediante MALDI-TOF MS.
- II. Desarrollar una base de datos con los perfiles espectrales de MALDI-TOF MS de las principales bacterias responsables de la intoxicación histamínica por

alimentos. Dicha base de datos pretende ser de utilidad en la prevención de la formación de histamina y en el diagnóstico rápido del microorganismo causante en una crisis alimentaria.

- III. Identificar y caracterizar específicamente *Streptococcus parauberis* alterantes y aislados por vez primera de productos marinos pasteurizados y envasados al vacío. Dicho objetivo se abordará mediante análisis fenotípico, análisis genómico y mediante MALDI-TOF MS, con el fin de definir biomarcadores que permitan su identificación rápida.
- IV. Desarrollar un método para la detección y cuantificación de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, microorganismos patógenos y/o alterantes aislados de productos marinos pasteurizados. Para ello se recurrirá a la técnica de PCR en Tiempo Real, diseñando cebadores y sondas TaqMan específicos.
- V. Aplicar la técnicas MALDI-TOF MS y el análisis de polimorfismos (SNPs) en el gen 16S ADNr para la identificación y clasificación de especies de *Bacillus* de relevancia en la industria alimentaria. Dichas técnicas se compararán con la PCR, secuenciación y análisis filogenético

3.RESULTADOS

3.1. CAPÍTULO 1

Caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de besugo (*Pagellus bogaraveo*) y rodaballo de acuicultura (*Psetta maxima*)

Characterisation of histamine-producing bacteria from farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*).

Inmaculada C. Fernández-No, Karola Böhme, Pilar Calo-Mata, Jorge Barros-Velázquez

Publicado en *International Journal of Food Microbiology*. Volumen 151, nº 2, páginas de la 182 a la 189, Diciembre 2011

RESUMEN

Rodaballo (*Psetta maxima*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*) son dos de las más importantes especies emergentes en la acuicultura europea. Sin embargo hasta el momento no se ha publicado información alguna en relación a la presencia y desarrollo de bacterias productoras de histamina en ellos. El objetivo de este trabajo ha sido aislar e identificar las principales bacterias productoras de histamina en rodaballo y besugo de acuicultura. Con este fin, se seleccionaron de manera preliminar en medio de Niven, 24 cepas microbianas (12 de rodaballo y 12 de besugo). Dos de estos aislamientos fueron confirmados como productores prolíficos de histamina mediante HPLC. Así, *Pseudomonas fragi* (aislada de rodaballo) y *Pseudomonas syringae* (aislada de besugo) produjeron 272 ± 69 ppm y 173 ± 45 ppm de histamina *in vitro*, respectivamente, tras incubación a 30 °C/24 h. Mientras que los filetes de rodaballo demostraron ser bastante resistentes a la formación de histamina a temperaturas inferiores a 10 °C, los filetes de besugo inoculados con *P. syringae* o la especie productora de histamina *Morganella morganii* acumularon 696 ± 84 y 760 ± 59 ppm de histamina, respectivamente, en esas condiciones. La identificación genética basada en la secuencia del gen 16S ADNr se llevó a cabo en paralelo con el análisis mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) de los perfiles espectrales de masas característicos de las cepas. La identificación bacteriana se logró por la detección de seis picos de masa específicos a nivel de especie en el rango de 2534-7183 m/z y 2536-9113 m/z para *P. fragi* y *P. syringae*, respectivamente. Asimismo, seis picos específicos de género y con valores de masas en el rango de 2218-4434 m/z fueron compartidos por ambas cepas.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Characterisation of histamine-producing bacteria from farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*)[☆]

I.C. Fernández-No, K. Böhme, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez^{*}

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2011

Received in revised form 27 July 2011

Accepted 24 August 2011

Available online 2 September 2011

Keywords:

Histamine poisoning

Turbot

Blackspot seabream

Pseudomonas

MALDI-TOF

Bacterial identification

ABSTRACT

Turbot (*Psetta maxima*) and blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) represent two of the most important emerging farmed fish species in European countries. However, no information of the presence and development of histamine-producing bacteria on them has been reported so far. Accordingly, the aim of this study was to isolate and identify the main histamine-producing bacteria in farmed turbot and blackspot seabream. For this study, 24 isolates (12 from turbot and 12 from blackspot seabream) were preliminarily selected on Niven medium. Two of these isolates were confirmed as prolific histamine producers by HPLC. Thus, *Pseudomonas fragi* (isolated from turbot) and *Pseudomonas syringae* (isolated from blackspot seabream) were able to produce 272 ± 69 ppm and 173 ± 45 ppm of histamine in vitro, respectively, after incubation at $30^\circ\text{C}/24$ h. While turbot fillets proved to be quite resistant to histamine formation at temperatures below 10°C , blackspot seabream fillets inoculated with *P. syringae* and the prolific histamine former *Morganella morganii* accumulated 696 ± 84 and 760 ± 59 ppm histamine, respectively, under such conditions. Genetic identification based on 16S rRNA sequencing was performed in parallel with the investigation of characteristic mass spectral profiles of the isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The MALDI-TOF MS analyses provided species-specific fingerprints, which allow rapid identification and classification of the isolates. Six genus-specific mass peaks in the range of 2218–4434 m/z were shared by both strains. Bacterial identification was achieved by the identification of six species-specific mass peaks in the ranges of 2534–7183 m/z and 2536–9113 m/z for *P. fragi* and *P. syringae*, respectively.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Histamine poisoning is a foodborne chemical intoxication caused by the consumption of foods containing toxic levels of histamine (Ben-Gigirey et al., 1999; Lehane and Olley, 2000). The consumption of histamine may provoke mild to severe illnesses with a variety of clinical symptoms (Taylor, 1986). Therefore, histamine poisoning represents an important health risk for consumers, and the presence of histamine in fish needs to be prevented.

Histamine forms in a variety of foods including wine, cheese, fermented meat, raw fish and fish products (Takahashi et al., 2003). In fish, histamine is sometimes called scombrototoxin because of the common association of histamine with scombroid fish species such as tuna and mackerel. However, histamine has also been linked to non-

scombroid fish (Bjornsdottir et al., 2009) with significant levels of histidine in their muscle tissue.

Histidine is directly decarboxylated into histamine as a result of the action of extracellular histidine decarboxylases biosynthesised by histamine-forming bacteria (Ben-Gigirey et al., 2000). Varieties of bacterial species possess this enzyme, giving them the ability to produce histamine. Moreover, many of these species have been isolated from seafood. The following bacteria have been classified as the major histamine formers: *Raoultella planticola* isolated from scombroid fish (Taylor et al., 1979); *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* isolated from frozen tuna (Taylor and Speckhard, 1983); *Photobacterium phosphoreum* and *Aeromonas hydrophila* isolated from refrigerated mackerel (Morii et al., 1988; Middlebrooks et al., 1988); *Staphylococcus xylosum* isolated from salted semi-preserved anchovies (Rodríguez et al., 2003); and *Enterobacter aerogenes* (Taylor, 1986), *Photobacterium damselae* (Okuzumi et al., 1994), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* isolated from other fish species. Histamine-forming bacteria have been reviewed by Kim et al. (2003) and Hungerford (2010).

Recently, the fishing sector has suffered from dwindling stocks of traditional species as a result of marked changes in their availability, which has prompted the development of aquaculture techniques to

[☆] GenBank accession numbers of the 16S rRNA gene sequences for *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02 isolated in this study are JF414902 and JF414901, respectively.

^{*} Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain. Tel.: +34 600942264; fax: +34 981825474.

E-mail address: jorge.barros@usc.es (J. Barros-Velázquez).

provide fish and other aquatic food products (Alvarez et al., 2009). Among the emerging farmed fish species with higher commercial value, blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*, which is also known as *Scophthalmus maximus*) are appreciated because of their firm and flavourful flesh. Farming has recently made these two species more available to consumers from European countries (Rodríguez et al., 2003). Turbot and blackspot seabream have moderate levels of histidine in their muscle tissues (0.30% and 0.36%, respectively), but to our knowledge no information is currently available about the potential risk of histamine formation in these species if histamine-forming bacteria are present. Although the microbial and biochemical quality of these species during storage has been previously studied (Alvarez et al., 2009; Rodríguez et al., 2003), only a preliminary study on potential histamine-producing bacteria has been reported for blackspot seabream (Alvarez et al., 2009).

Accordingly, the first aim of this work was to isolate and identify histamine-producing bacteria from farmed turbot and blackspot seabream, and to elucidate if these fish species may exhibit any significant risk of histamine accumulation. The second aim was to use matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, which is a powerful technique for bacterial identification (Böhme et al., 2010c; Russell, 2009; van Baar, 2000), as a tool for the definition of species-specific markers, allowing the direct and rapid identification of the major histamine-forming isolates and differentiation of these isolates with respect to other histamine-producing bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and screening of potential histamine-forming isolates from farmed turbot (*P. maxima*) and blackspot seabream (*P. bogaraveo*)

The size and weight of the turbot specimens ranged from 39 to 46 cm and from 1600 to 1900 g, respectively. The size and weight of the blackspot seabream specimens ranged from 30 to 34 cm and from 430 to 630 g, respectively. Fish specimens were purchased from a local aquaculture facility, and they were transported to the laboratory under refrigerated conditions (4 °C). The fish specimens were handled and sampled considering that their sizes and the sampling procedures may affect the results of histamine formation, as previously reported (Love, 1988; 2006). The specimens were not headed or gutted. Unskinned fish muscle samples (25 g) from the dorsal region were aseptically dissected at day zero and at different times of refrigerated storage (4 °C), and the samples were homogenised with sterile 0.1% peptone water (Oxoid Ltd., London, UK) in a Stomacher as previously described (Ben-Gigirey et al., 1998). Serial dilutions were seeded onto Niven medium plates, which screen for the detection of potential histamine-forming bacteria (Niven et al., 1981), and the plates were incubated at 30 and 37 °C for 72 h. The plates were examined every 24 h for the presence of purple colonies surrounded by purple halos on a yellowish background. The purple halo indicates an increase in the pH of the medium and, thus, a positive reaction.

2.2. Confirmation of histamine production in vitro by HPLC

All isolates showing a positive reaction in the screening test were further investigated for their ability to produce histamine. Selected isolates were seeded on trypticase soy agar (Oxoid) supplemented with 0.1% L-histidine (0.1% TSAH) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and incubated at 30 °C for 24 h. A loopful from each pure culture was inoculated in 9 mL of trypticase soy broth (Oxoid) supplemented with 2% L-histidine (2% TSBH; pH 5.8) and 0.0005% pyridoxal HCl (Sigma), and the cultures were incubated at 30 °C for 24 h. Aliquots (1 mL) of these cultures were transferred to new tubes containing 9 mL of the same broth, and they were incubated for an additional 18 h at 30 °C. When necessary, incubation was extended for an additional 24 h. Samples (5 mL) of these broth cultures were collected

with a sterile syringe, filtered through a 0.22-µm membrane (Millipore, France), and kept at –25 °C until analysis. Blank assays consisting of 2% TSBH (pH 5.8) supplemented with 0.0005% pyridoxal HCl were also analysed.

The determination of histamine in the filtered broth cultures was carried out by HPLC. A procedure previously used in our laboratory for seafood products was used (Ben-Gigirey et al., 1998; Ben-Gigirey et al., 1999; Vieites et al., 1997) with minor modifications in the preparation of extracts. Briefly, 1 mL of each filtered broth was added to 9 mL of 0.4 M perchloric acid, and the mixture was homogenised with an Ultraturrax T-25 blender (Ika-Labortechnik, Germany). Each homogenate was then centrifuged at 3000 × g for 10 min, and the supernatant was filtered through Whatman No. 1 filter paper (Whatman International Ltd., Maldstone, UK). The preparation of histamine standard solutions and derivatisation of sample extracts and standards were carried out as previously described (Ben-Gigirey et al., 1998). The major histamine formers (Taylor and Speckhard, 1983; Taylor, 1986), *M. morganii* BM 65A and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, were used as positive controls.

The HPLC equipment consisted of a Waters 600E HPLC multisolvent delivery system, UV/VIS Waters 486 Tunable Absorbance Detector, and Millennium 2010 Software. A Nucleosil 120 C₁₈ column (5 µm; 150 mm × 4 mm; Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) and a C₁₈ guard column (Tracer) were used. The following mobile phases were used: 0.1 M ammonium acetate (solvent A) (Merck, Darmstadt, Germany) and acetonitrile (solvent B) (Scharlau, Barcelona, Spain). The programme involved a linear elution gradient starting at 50% solvent B and ending at 90% solvent B over 19 min with a flow rate of 1 mL/min. Detection of the histamine in the column effluent was carried out at 254 nm.

2.3. Artificial contamination of turbot and blackspot seabream by histamine-producing strains *P. fragi* Turb47, *P. syringae* Seab02 and *M. morganii* BM 65A

With a view to elucidating the capacity of turbot and blackspot seabream to mediate histamine poisoning events, histamine-producing strains *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02 were inoculated in turbot and blackspot seabream fillets, the fish species from which each strain had been isolated, respectively. Briefly, turbot and blackspot seabream specimens were aseptically dissected to obtain fillets with weights in the 95–105 g range. Afterwards, single colonies of *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02 were inoculated in BHI broth (Oxoid) and incubated at 30 °C until a bacterial concentration of 1.65×10^6 CFU/mL was reached, this corresponding to a value of 0.5 in the McFarland scale. Portions of 1 mL of these cultures were taken and used to inoculate the fillets by pipetting during 1 min. The fillets were then introduced in sterile plastic bags and incubated at 10 °C for six days and afterwards at 4 °C for 5 days. The prolific histamine-former *M. morganii* BM 65A was considered as positive control and used to inoculate turbot and blackspot seabream fillets by triplicate in parallel.

Samples (25 g) of the inoculated products were taken after four and eight days of incubation, homogenised in 225 mL of sterile 0.1% peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) and seeded onto either Phenol Red Agar (Merck), selective for *Pseudomonas* spp., or VRBG Agar (Merck), selective for *M. morganii*, respectively. Once the incubation had been completed on day 11, fillet samples were investigated in their histamine content by triplicate, as described by Vieites et al. (1997).

2.4. Genetic identification of histamine-forming isolates from turbot and blackspot seabream by nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene

Histamine-forming isolates were inoculated in brain heart infusion broth (BHI; Oxoid) and incubated at 37 °C for 24 h. The DNA was then extracted using the commercial DNeasy tissue kit (Qiagen, Valencia,

CA, USA) as previously described (Hosseini et al., 2009). DNA concentration in the purified extracts was determined by fluorometry using the Qubit TM method (Invitrogen, Paisley, UK).

Bacterial amplification of the 16S rRNA gene was performed with the following highly conserved 16S rDNA primer pair: p8FPL (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and p806R (5'-GGACTACCAAGGTATC-TAAT-3') (Angert et al., 1993; Relman et al., 1992). Each amplification assay used 100 ng of template DNA, 25 µL of a master mix (reaction buffer, dNTPs, magnesium chloride, and Taq DNA polymerase) (BioMix, Bioline, London, UK), double-distilled water, and 25 pmol of each primer to achieve a final volume of 50 µL. The amplification conditions were as follows: 1) denaturing step at 94 °C for 7 min; 2) 35 cycles of denaturation (94 °C for 60 s), annealing (55 °C for 60 s) and extension (72 °C for 60 s); and 3) final extension at 72 °C for 15 min. All polymerase chain reaction (PCR) assays were carried out on a MyCycler thermal cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The PCR products were visualised by SYBR Safe staining (Invitrogen) of a 2.5% horizontal agarose electrophoresis gel, which was run at 100 V.

Prior to sequencing, the PCR products were purified using the Exo-SAP-IT kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used for PCR were also employed to sequence both strands of the PCR products. Sequencing reactions were analysed with an automatic sequencing system (ABI 3730XL DNA Analyser, Applied Biosystems) equipped with the POP-7 system. SNPs in the DNA sequences were carefully reviewed by eye using Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia). Sequence alignment was accomplished using CLUSTALW software (Thompson et al., 1994). Sequence homologies were investigated using the BLAST tool (National Centre for Biotechnology Information). Nucleotide sequences were compared and aligned among themselves and with respect to other sequences present in databases using CLUSTALW software (Thompson et al., 1994), and analyses were conducted using MEGA software (Kumar et al., 2008). The analyses consisted of the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) with 1000 bootstrap replicates to construct distance-based trees. Table 1 compiles the list of histamine-producing bacterial strains and other bacterial strains of relevance in seafood safety considered during phylogenetic analysis.

2.5. Phenotypic investigation of histamine-forming isolates

The production of extracellular proteases by the selected isolates was investigated by a casein hydrolysis test as previously described (Ben-Gigirey et al., 2000). Briefly, a basal medium consisting of 0.75 g of beef extract (Oxoid), 1.25 g of bacto-tryptone (Oxoid), 0.25 g of glucose (Sigma) and 4.25 g of agar (Oxoid) in 190 mL of deionised water was prepared, and the pH was adjusted to 6.5. The medium was autoclaved for 15 min at 121 °C. Skim milk powder (6 g) (Oxoid) was then added to 60 mL of deionised water, and this solution was mixed in a mortar. The pH was adjusted to 6.5, and the mixture was autoclaved for 5 min at 121 °C. Finally, the skim milk suspension was mixed with the basal medium and poured into Petri dishes. After 48 h at 30 °C, protease production was evaluated by the visualisation of transparent zones surrounding the colonies on an opaque background.

The production of extracellular lipases by the histamine-forming isolates was investigated in nutrient agar tributyrin (NAT) medium, which consisted of 1.3% nutrient broth (Oxoid), 1% tributyrin (Sigma) and 2% agar (Oxoid). Preparation of the medium was carried out as previously described (Ben-Gigirey et al., 2000). Briefly, all components, except tributyrin, were boiled in deionised water and cooled to 70 °C. Tributyrin was then added to the mixture followed by vigorous stirring for 3 min with an Ultraturrax T-25 homogeniser (Ika-Labortechnik, Germany) at a high speed to emulsify the mixture. The pH value was then adjusted to 7.5. The medium was sterilised

Table 1
Histamine-forming bacterial species and other bacterial species from seafood considered in the phylogenetic and phyloproteomic analyses.

Bacterial strain	GenBank accession number	Reference
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	CP000462	Middlebrooks et al. (1988)
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	FJ971857	Kim et al. (2003)
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	FJ971882	Taylor (1986)
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	FJ971883	Kim et al. (2003)
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 9760	FJ971884	Taylor and Speckhard (1983)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	FJ971886	Taylor and Speckhard (1983)
<i>Lactobacillus</i> sp. 30A ATCC 33222	FJ971864	Pessione et al. (2005)
<i>Morganella morganii</i> BM 65A	FJ971858	Taylor and Speckhard (1983)
<i>Photobacterium damsela</i> ATCC 33539	FJ971859	Okuzumi et al. (1994)
<i>Photobacterium phosphoreum</i> CECT 4172	FJ971860	Morii et al. (1988)
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 9484	FJ971888	Kim et al. (2003)
<i>Raoultella planticola</i> ATCC 33531	FJ971885	Kim et al. (2003)
<i>Staphylococcus xylosum</i> ATCC 29971	FJ971865	Rodríguez Jerez et al. (1994)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 25MC6	FJ971861	Ben-Gigirey et al. (2000), Ben-Gigirey et al. (2002)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 15MF	FJ971862	Ben-Gigirey et al. (2000), Ben-Gigirey et al. (2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	FJ971870	Böhme et al. (2010c)
<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973	FJ971870	Böhme et al. (2010c)
<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19310	FJ971870	Böhme et al. (2010c)

in an autoclave for 15 min at 121 °C, and it was then poured into Petri dishes in a single-layer fashion. After 48 h at 25 °C, lipase production in NAT medium was visualised as colonies with well-defined clear zones extending for at least 1 mm from the edge of the colony.

2.6. Proteomic analysis by MALDI-TOF MS

For MALDI-TOF MS analysis, small soluble proteins were extracted from intact bacterial cells using a fast method (Böhme et al., 2010a). Bacterial strains were grown on PCA (Oxoid) at 37 °C for 24 h. One loopful (1-µL loop) of each bacterial culture was harvested and placed in 100 µL of a solution consisting of 50% acetonitrile (ACN) (Merck, Darmstadt, Germany) and 1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) (Acros Organics, Morris Plains, NJ). These solutions were then mixed by vortexing. After centrifugation at 8000 rpm for 10 min, the supernatants were transferred to new tubes, and they were stored at -20 °C until analysis. An aliquot (1 µL) of each sample solution was mixed with 10 µL of a matrix solution consisting of 10 mg of α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α-CHCA) in 1 mL of 50% ACN and 2.5% aqueous TFA. From this final solution of sample and matrix, an aliquot (1 µL) was manually deposited onto a stainless steel plate and allowed to dry at room temperature. Mass spectra were obtained using a Voyager DE STR MALDI-TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems) operating in a linear mode and extracting positive ions with an accelerating voltage of 25,000 V and delay time of 350 ns. The grid voltage and guide wire were set to 95% and 0.05%, respectively. Each spectrum was the accumulated sum of at least 1000 laser shots, which were obtained from 10 different regions and manually selected from the same sample spot in a range of 1500–15,000 Da.

For every strain, two extractions were carried out, and both extractions were measured in duplicate, thus giving four spectra for each

bacterial strain. The spectra were calibrated using an external protein calibration mixture (oxidised insulin chain B and bovine insulin) (Sigma), and they were analysed with DataExplorer software (Version 4.0.0.0). Mass spectra were baseline-corrected and noise-filtered. The data lists containing m/z values were extracted from the mass spectra including signals with relative intensities above 2%. The obtained peak mass lists were analysed and compared using peaks in the mass range of 2000–10,000 Da due to the good reproducibility of the spectral profile in that mass range. Mass lists were further processed with the free web-based application, SPECLUST, which is available at <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> (Alm et al., 2006). The web application allowed calculation of the differences between peak lists and the determination of common peak masses. This tool was used to examine the four spectra of each sample extracting representative peaks present in all four spectra and taking into account a peak match score greater than 0.7, which corresponds to a measurement error of ± 5 Da. Furthermore, the obtained spectra and peak mass lists of the two isolates were compared with a reference library created in our laboratory from previous studies (Böhme et al., 2010b; Fernández-No et al., 2010). The library included mass spectral data of the main pathogenic and spoilage bacterial species potentially present in seafood (Table 1).

3. Results

3.1. Isolation of potential histamine-producing bacteria and confirmation of histamine production by HPLC

Twenty-four microbial isolates (12 from turbot and 12 from blackspot seabream) exhibited a positive reaction in the screening medium as visualised by the presence of purple colonies surrounded by purple halos on the yellowish background of Niven medium. To confirm which of the positive isolates were true histamine producers, all of the positive isolates were evaluated in 2% TSBH (pH 5.8) supplemented with 0.0005% pyridoxal HCl, and histamine production was determined after incubation at 30 °C for 24 h. Only 2 of the 24 isolates showing a positive reaction in the screening test were able to produce histamine at a level greater than 10 ppm in the confirmation assay (Table 2). The Seab02 isolate from blackspot seabream produced 173 ± 45 ppm histamine, and the Turb47 isolate from turbot produced 272 ± 69 ppm histamine (Table 2). Remarkably, the Turb47 isolate accumulated more histamine than the major histamine-forming bacteria, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, which was used as a positive control in this study (Table 2), and the Seab02 isolate exhibited a slightly lower activity. As expected from a previous study (Kim et al., 2003), *M. morgani* was the most intense histamine-forming bacteria in this study.

Table 2
In-vitro histamine formation by bacterial strains isolated from farmed seabream and turbot.

Bacterial isolate/strain	GenBank accession number	Histamine (ppm)	Origin
<i>Pseudomonas syringae</i> Seab02	JF414901	173 ± 45	This study
<i>Pseudomonas fragi</i> Turb47	JF414902	272 ± 69	This study
<i>Morganella morganii</i> ^a BM 65A	FJ971858	>350	Taylor and Speckhard (1983)
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	FJ971882	270 ± 50	Taylor and Speckhard (1983)

^aKindly provided by Prof. Teresa Mora-Ventura, Autonomous University of Barcelona. *M. morganii* and *E. aerogenes* were considered as positive controls.

3.2. Identification of isolates by nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene and phylogenetic analysis

The Seab02 and Turb47 isolates (confirmed as major histamine producers isolated from blackspot seabream and turbot, respectively) were subjected to genetic fingerprinting using universal primers targeted to the 16S rRNA gene. The 800-bp amplicons obtained for each isolate were analysed and compared with other reference strains from GenBank using the BLAST tool. A high similarity of both isolates with *Pseudomonas* spp was observed. Phylogenetic analysis clearly revealed the grouping of both isolates in the *Pseudomonas* cluster. The analysis confirmed the identification of the Seab02 isolate as a *P. syringae* strain, which is highly homologous to *P. syringae* ATCC 19310. Moreover, the analysis confirmed the identification of the Turb47 isolate as a *P. fragi* strain, which is highly homologous to *P. fragi* ATCC 4963 (Fig. 1).

Analysis of the proteolytic phenotype in both strains demonstrated the production of intense clearing zones in the areas surrounding the bacterial biomass after incubation at 30 °C for 48 h. The production of extracellular lipases was evaluated at 30 °C in NAT medium. The Seab02 and Turb47 isolates did not exhibit clearing zones on tributyrine, indicating the non-production of extracellular lipases.

3.3. Susceptibility of turbot and blackspot seabream to histamine accumulation

The susceptibility of these added-value fish species to histamine accumulation has not been investigated before. For it, turbot and blackspot seabream fillets were inoculated with *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02, respectively, and stored at 10 °C and 4 °C as described in Section 2.3. The results, presented in Table 3, indicated that both strains grew to levels above 9 log units at such temperatures in turbot and blackspot seabream fillets, a result also observed for the prolific histamine-forming *M. morganii* BM 65A strain inoculated in parallel. Interestingly, turbot muscle proved to be quite resistant to histamine accumulation, with final concentrations below 30 ppm being determined after 11 days of storage. On the other hand, blackspot seabream was much more susceptible to the action of histamine-forming bacteria, since histamine concentrations of 696 and 760 ppm were accumulated after 11 days of storage by the action of *P. syringae* and *M. morganii*, respectively (Table 1).

3.4. MALDI-TOF MS fingerprinting and phyloproteomic analysis

For each of the two isolates, four spectra were obtained by MALDI-TOF MS analysis. Peak mass lists were extracted, and the four lists for each strain were compared with the SPECLUST web application, which compared common peak masses present in all four spectra. Arithmetic means were calculated for m/z values, and the standard deviations were less than 3 Da. According to these specifications, specific mass lists were generated for each bacterial isolate representing reproducible bacterial fingerprints (Table 4). To classify the species, the spectral profiles and peak mass lists were compared to the spectral data of bacterial species belonging to the *Pseudomonas* genus and other strains of relevance for seafood safety and quality (Table 1). When comparing the peak mass lists, three peak masses were identified as genus-specific peaks for *Pseudomonas* (highlighted with * in Fig. 2). Remarkably, the Turb47 isolate spectrum shared common peaks (highlighted with ▼ in Fig. 2) with the *P. fragi* ATCC 4973 strain, and the Seab02 isolate spectrum shared common peaks (highlighted with o in Fig. 2) with the *P. syringae* ATCC 19310 strain. These results confirmed the phylogenetic analysis (Fig. 1).

Clustering of the elaborated mass lists from both of the histamine-forming isolates and the other bacterial strains considered in this study was performed by phyloproteomics with the SPECLUST web application (Fig. 3). These clustering results confirmed the previous

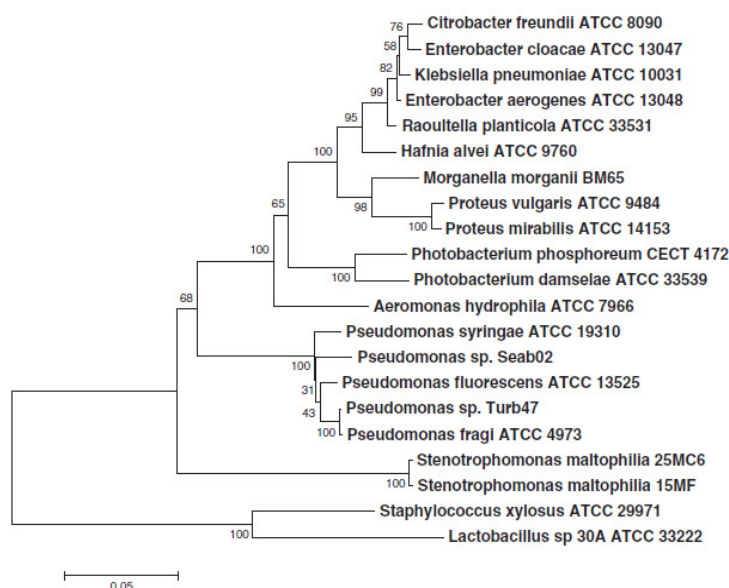


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequences of amine-producing bacteria, three strains from American Type Culture Collection (ATCC) belonging to the *Pseudomonas* genus and the two isolated strains using the neighbour-joining method. Numbers above and below branches indicate bootstrap values from the neighbour-joining analysis.

results grouping the Turb47 isolate in a branch with *P. fragi* and the Seab02 isolate in a branch with *P. syringae* (Fig. 3).

4. Discussion

Histamine is formed in fish by the decarboxylation of free histidine due to the action of bacteria harbouring the histidine decarboxylase gene. Histamine is a biogenic amine with a high toxic potential. Histamine produces an intoxication known as histamine poisoning, which is a syndrome that may damage consumer health depending on the amount of histamine ingested (Taylor, 1986). Once histidine decarboxylase is released to the extracellular medium, it may be active under refrigeration or after thawing, even though the bacterial cells were previously inactivated by freezing (Ben-Gigirey et al., 1998). Moreover, once histamine is formed, it cannot be eliminated by any food process including sterilisation (Pan and James, 1985). Therefore, it is important to detect and identify histamine-producing bacteria in commercial fish species containing significant levels of histidine as a preventive tool prior to histamine accumulation. In this study, two major histamine-forming bacteria were isolated from farmed turbot and blackspot seabream. Although both fish species contain moderate concentrations of histidine, approximately 0.35%, in their muscle tissues (NIFES, 2011), no information about their potential mediation of histamine poisoning events has been previously reported. Moreover, both fish species have received increasing attention in European aquaculture facilities due to

their high commercial value, which underlines the need of controlling potential safety risks.

A previous study (Alvarez et al., 2009) has considered molecular tools to identify presumptive histamine-producing bacteria isolated in Niven screening medium, but it did not consider the confirmation of histamine production by HPLC. In this study, the formation of histamine by two bacterial strains isolated from blackspot seabream and turbot was confirmed by HPLC. This technique allowed the false-positives produced in Niven screening medium to be discarded, allowing the selection of true histamine-producing bacteria. Remarkably, only 2 isolates out of the 24 isolates selected as positives in the Niven medium were true histamine producers.

Both histamine-forming bacterial isolates belonged to the *Pseudomonas* genus, which represents a microbial group commonly found in fish and other fresh foods as specific spoilage organisms. Thus, these microorganisms have been proposed as specific spoilage bacteria of iced fresh fish regardless of the origin of the fish (Gram and Huss, 1996; Shewan et al., 1960). Although previous studies have reported the isolation of histamine-producing *Pseudomonas putida* or *Pseudomonas fluorescens* from other fish species (Austin, 2006; Kim et al., 2003), the present study identified for the first time *P. fragi* and *P. syringae* as major histamine-forming bacteria present in farmed turbot and blackspot seabream, respectively. *P. fragi* has been previously reported to produce fruity-off odours in fish, as a consequence of the ethyl esters produced during glucose metabolism (Miller III

Table 3

Microbial counts and histamine formation by strains *Pseudomonas fragi* Turb47, *Pseudomonas syringae* Seab02 and *Morganella morganii* BM 65A (positive control) in artificially-inoculated turbot and blackspot seabream fillets stored at 10 °C/6 d and at 4 °C/5 d.

Fish species/bacterial strain	Microbial counts ^a (log CFU/g) Day 0	Microbial counts (log CFU/g) Day 4	Microbial counts (log CFU/g) Day 8	Histamine (ppm) Day 11
Blackspot seabream/ <i>Pseudomonas syringae</i> Seab02	6.20	11.45	11.49	696 ± 84
Blackspot seabream/ <i>Morganella morganii</i> BM 65A	6.20	9.15	11.95	760 ± 59
Turbot/ <i>Pseudomonas fragi</i> Turb47	6.20	9.83	11.05	30.0 ± 7
Turbot/ <i>Morganella morganii</i> BM 65A ^b	6.20	10.63	11.74	22.7 ± 7

^a Microbial counts of *P. fragi* and *P. syringae* were determined on Phenol Red Agar and *M. morganii* on VRBG Agar.

^b The prolific histamine-forming *M. morganii* BM 65A was considered as positive control.

Table 4

Peak mass lists of bacterial isolates from turbot and blackspot seabream in addition to other *Pseudomonas* strains from ATCC.

Bacterial species	Peak mass list
<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973	2218, 2534, 3023, 3306, 3593, 3618, 3802, 4128, 4434, 4466, 5066, 5659, 6045, 6379, 6611, 7184, 7236, 7603, 8258, 8343, 8931, 9131, 9560, 9896
<i>Pseudomonas fragi</i> Turb47	2218, 2534, 2840, 3005, 3023, 3306, 3566, 3593, 3741, 3794, 3871, 4127, 4400, 4433, 4451, 4949, 5066, 5523, 5678, 6007, 6043, 6609, 7183, 7480, 7584, 7741, 8903
<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19310	2218, 2563, 2988, 3329, 3586, 3618, 3634, 3789, 4127, 4433, 4552, 4835, 4898, 4936, 5123, 5653, 5669, 5805, 5972, 6354, 6420, 6651, 7051, 7170, 7575, 8067, 8251, 9101, 9667, 9794, 9871
<i>Pseudomonas syringae</i> Seab02	2218, 2563, 3030, 3283, 3305, 3587, 3785, 3803, 3971, 4071, 4129, 4434, 4559, 4824, 4883, 5124, 5543, 5612, 5924, 5987, 6060, 6320, 6611, 7173, 7810, 7941, 8142, 8209, 9113, 9646, 9762

Peak masses are presented as $[M + H]^+$ values. Species-specific peaks are highlighted in bold, and genus-specific peaks are highlighted in bold italics.

et al., 1973; Gram, 2006). Glucose depletion leads then to the bacterial action on fish aminoacids (Daalgard, 2006).

The production of histamine by both strains was moderate, reaching levels greater than 170 ppm and 270 ppm for *P. syringae* and *P. fragi*, respectively (Table 2). Remarkably, *P. syringae* produced more histamine than the major histamine former, *E. aerogenes* ATCC 13048, which highlighted the potential risk to the safety of blackspot

seabream. Both strains exhibited a proteolytic phenotype, emphasising the potential hazard of their activity on post-mortem fish muscle caused by the microbial action on fish proteins to produce amino acids, which may serve as substrates for biogenic amine formation. However, this study demonstrated that turbot is quite resistant to histamine formation, even after its artificial inoculation with the prolific histamine former *M. organii*. Thus, the inoculation of turbot

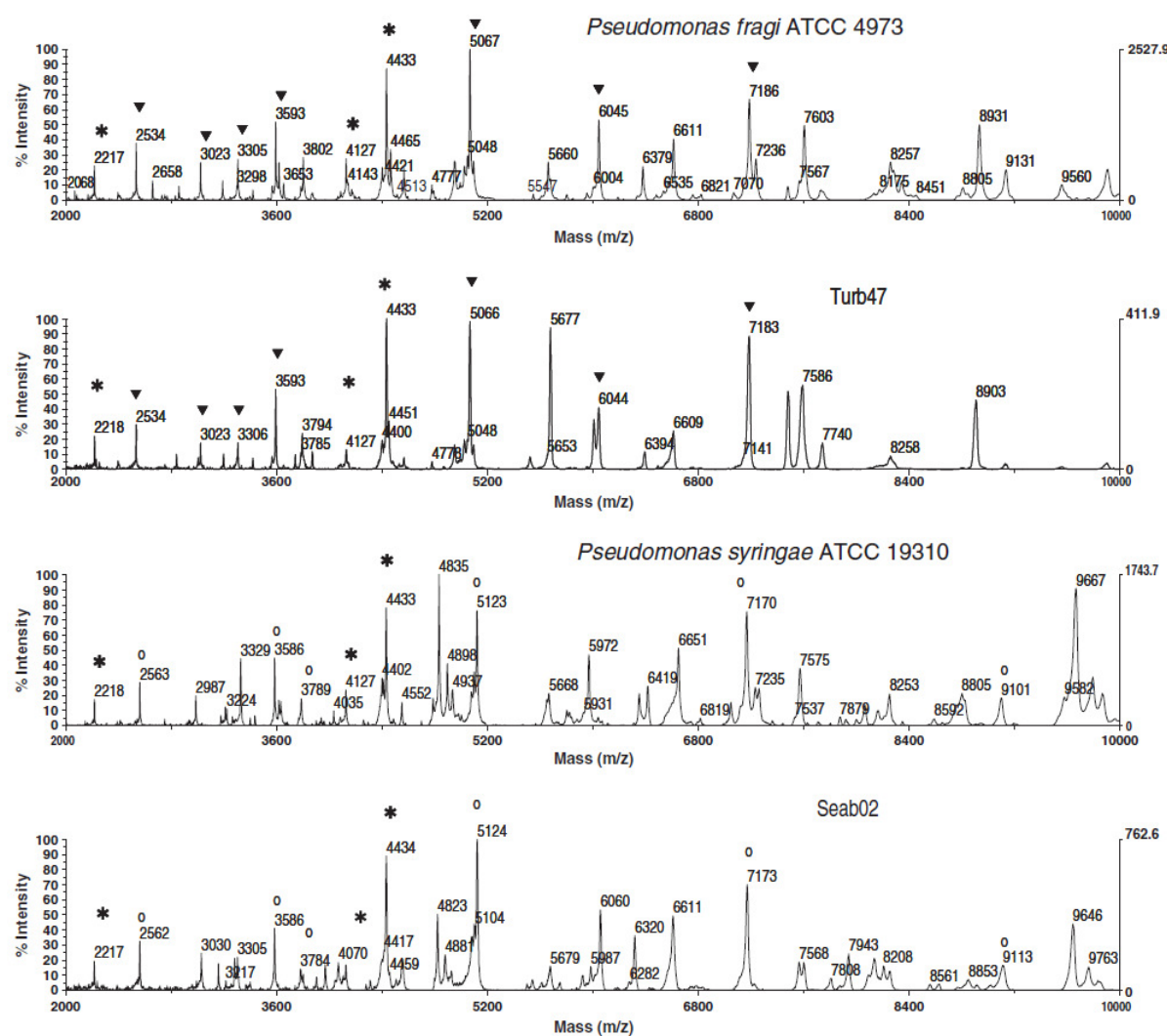


Fig. 2. MALDI-TOF MS spectral profiles of *Pseudomonas fragi* ATCC 4973, Turb47 isolate, *Pseudomonas syringae* ATCC 19310 and Seab02 isolate. Species-specific peaks of *Pseudomonas fragi* are indicated by (▼), and species-specific peaks of *Pseudomonas syringae* are indicated by (○). Genus-specific peaks are indicated by (*).

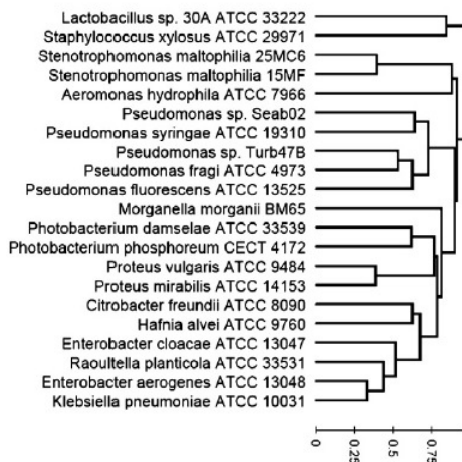


Fig. 3. Phyloproteomic tree of studied species. The scale located below the dendrogram indicates the relative distance used in the clustering.

muscle with either *P. fragi* or *M. morganii* at the levels and refrigeration temperatures considered by other authors (Emborg et al., 2005) led to histamine levels below 30 ppm after six days of storage at 10 °C and five days at 4 °C. Although it is expected that histamine formation might be more intense at higher temperatures, as it has been previously reported (Kim et al., 2000), with the data compiled in this study it can be concluded that the presence of histamine-forming bacteria in turbot does not represent a significant risk of histamine poisoning. On contrast, the inoculation of blackspot seabream muscle with *P. syringae* or *M. morganii*, led to histamine concentrations of 696 and 760 ppm respectively. Although these concentrations might be considered moderately high, we should underline that these were achieved at temperatures of 10 °C and 4 °C. Thus, such concentrations might be increased at temperatures higher than those considered in this study, as previously reported (Kim et al., 2000). This study also demonstrated that histamine formation in blackspot seabream was not related to *Enterobacteriaceae*, as it has often been reported for other fish species (Ben-Gigirey et al., 1998; Kim et al., 2001; López Sabater et al., 1994).

With the aim of achieving a rapid and specific identification of both histamine-forming bacteria, MALDI-TOF MS was used. This technique is a fast and cost-effective technique to differentiate bacterial species (Giebel et al., 2010; Lay, 2001). The mass spectrometric profiles obtained for *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02 represented specific spectral profiles. The profiles provided peak mass lists that were easily differentiated from all other bacterial species present in the reference library including the most relevant spoilage and pathogenic bacteria present in fish and seafood products. Furthermore, six species-specific mass peaks in the ranges of 2534–7183 m/z and 2536–9113 m/z were identified for *P. fragi* and *P. syringae*, respectively. The specificity of these peaks emphasised the relevance for these to be used as biomarker peaks for identification assays (Table 4).

The comparison of spectral profiles of unknown bacterial strains to a spectral reference library easily allows the classification and identification of strains in a rapid and accurate way (Böhme et al., 2010a; Seng et al., 2009). Because we have previously reported the differential classification of histamine-forming bacteria by peptide mass fingerprinting (Fernández-No et al., 2010), the spectra corresponding to *P. fragi* Turb47 and *P. syringae* Seab02 were compared with these spectral databases to allow their classification. The results of the proteomic analysis confirmed the classification of the Turb47 and Seab02 strains as *P. fragi* and *P. syringae*, respectively (Fig. 3), which further verified the results of the phylogenetic analysis (Fig. 1).

In summary, this study reported for the first time the isolation of histamine-producing strains of *P. fragi* and *P. syringae* from farmed turbot and farmed blackspot seabream, respectively. While turbot does not represent a significant risk, blackspot seabream accumulated moderately high amounts of histamine under refrigeration below 10 °C, a result that underlines its potential risk as mediator of histamine poisoning events. Finally, the MALDI-TOF MS analysis provided a simple and robust technique to identify the species-specific peak mass lists permitting the rapid identification of these microorganisms in fish and other food products.

Acknowledgments

This work was funded by project 10PIXB261045PR from Xunta de Galicia and by project AGL2010-19646 from the Spanish Ministry of Science and Technology. I.C. Fernández-No and K. Böhme received the “Lucas Labrada” and “Maria Barbeito” research contracts from Xunta de Galicia, respectively.

References

- Alm, R., Johansson, P., Hjerno, K., Emanuelsson, C., Ringner, M., Hakkinen, J., 2006. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of Proteome Research* 5, 785–792.
- Alvarez, V., Feas, X., Barros-Velazquez, J., Aubourg, S., 2009. Quality changes of farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) subjected to slaughtering and storage under flow ice and ozonised flow ice. *International Journal of Food Science Technology* 44, 1561–1571.
- Angert, E., Clements, K., Pace, N., 1993. The largest bacterium. *Nature* 362, 239–241.
- Austin, B., 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal* 6, 931–945.
- Ben-Gigirey, B., De Sousa, J., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection* 61, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., de Sousa, J., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection* 62, 933–939.
- Ben-Gigirey, B., de Sousa, J., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology* 57, 19–31.
- Ben-Gigirey, B., Vieites, J., Kim, S., An, H., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 2002. Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control* 13, 293–299.
- Bjornsdottir, K., Bolton, G., McClellan-Green, P., Jaykus, L., Green, D., 2009. Detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *Journal of Food Protection* 72, 1987–1991.
- Böhme, K., Fernández-No, I.C., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J.M., Cañas, B., Calo-Mata, P., 2010a. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Methods* 2, 1941–1947.
- Böhme, K., Fernández-No, I.C., Gallardo, J.M., Cañas, B., Calo-Mata, P., 2010b. Safety assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food and Bioprocess Technology* 4, 907–918.
- Böhme, K., Fernández-No, I., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J., Calo-Mata, P., Cañas, B., 2010c. Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Journal of Proteome Research* 9, 3169–3183.
- Dalgaard, P., 2006. Microbiology of marine muscle foods. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Chapter 53, Vol. 1. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 1–20.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Daalgard, P., 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C — effect of vacuum- and modified atmosphere packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 101, 263–279.
- Fernández-No, I., Böhme, K., Gallardo, J., Barros-Velazquez, J., Cañas, B., Calo-Mata, P., 2010. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 31, 1116–1127.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S., Kleinheinz, G., Robbins, M., Sandrin, T., 2010. Microbial fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges. *Advances in Applied Microbiology* 71, 149–184.
- Gram, L., 2006. Microbial food spoilage. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Chapter 51, I. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 1–16.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121–137.
- Hosseini, S., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, I., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J., 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1392–1403.

- Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: a review. *Toxicol* 56, 231–243.
- Kim, S.H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R.J., An, H., 2000. Histamine and biogenic amine formation by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection* 63, 244–251.
- Kim, S.H., Field, K., Morrissey, M., Price, R., Wei, C., An, H., 2001. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection* 64, 1035–1044.
- Kim, S.H., Barros-Velazquez, J., Ben-Gigirey, B., Eun, J., Jun, S., Wie, C., 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. *Food Science and Biotechnology* 12, 451–460.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299–306.
- Lay, J., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 172–194.
- Lehane, J., Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* 58, 1–37.
- López Sabater, E., Rodríguez Jerez, J., Roig Sagues, A., Mora Ventura, M., 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning-effect of tuna handling on presence of histidine-decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection* 57, 318–323.
- Love, R.M., 1988. *The Food Fishes, Their Intrinsic Variation and Practical Implications*. Farrand Press, London, UK.
- Love, R.M., 2006. Fish biology and food science. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Chapter 35, I. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 1–21.
- Middlebrooks, B., Toom, P., Douglas, W., Harrison, R., McDowell, S., 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *Journal of Food Science* 53, 1024–1029.
- Miller III, A., Scanlon, R.A., Lee, J.S., Libbey, L.M., 1973. Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology* 25, 952–955.
- Morii, H., Cann, D., Taylor, L., 1988. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 299–305.
- NIPES, 2011. National Institute of Nutrition and Seafood Research. Seafood data P.O. Box 2029 Nordnes – 5817 Bergen – Norway Available at www.nifes.no 2011 Accessed 23 February 2011.
- Niven, C.F., Jeffrey, M.B., Corlett, D.A., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 321–322.
- Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Fujii, T., 1994. *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 631–636.
- Pan, B.S., James, D., 1985. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. *FAO Fisheries Technical Paper* 252-FIU/T252. Rome, Italy.
- Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., 2005. A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics* 5, 687–698.
- Relman, D., Schmidt, T., MacDermott, R., Falkow, S., 1992. Identification of the uncultured *Bacillus* of Whipple's disease. *The New England Journal of Medicine* 327, 293–301.
- Rodríguez Jerez, J., Mora Ventura, M., López Sabater, E., Hernández Herrero, M., 1994. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semipreserved anchovies. *Journal of Food Protection* 57, 784–787.
- Rodríguez, O., Barros-Velazquez, J., Ojea, A., Pineiro, C., Aubourg, S., 2003. Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 68, 2764–2771.
- Russell, S., 2009. Microorganism characterization by single particle mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 376–387.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543–551.
- Shewan, J.M., Hobbs, G., Hodgkiss, W., 1960. The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *The Journal of Applied Bacteriology* 23, 463–468.
- Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., Fujii, T., 2003. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2568–2579.
- Taylor, S., 1986. Histamine food poisoning-toxicology and clinical aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 17, 91–128.
- Taylor, S., Speckhard, M., 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review* 45, 35–39.
- Taylor, S., Guthertz, L., Leatherwood, M., Lieber, E., 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 274–278.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. Clustal-W – improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- van Baar, B., 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 193–219.
- Vieites, J.M., Castro, S., Rodríguez, M., 1997. Métodos de determinación de aminas biogénas en productos de la pesca y sus transformados mediante HPLC. *Alimentaria* 279, 55–63.

3.2. CAPÍTULO 2

Caracterización diferencial de bacterias productoras de aminas biógenas relacionadas con intoxicaciones histamínicas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting

Inmaculada C. Fernández-No, Karola Böhme, José M. Gallardo, Jorge Barros-Velázquez, Benito Cañas, Pilar Calo-Mata

Publicado en *Electrophoresis* Volume 31, nº 6, páginas de la 1116 a la 1127, Marzo 2010

RESUMEN

La intoxicación histamínica es un síndrome de origen alimentario producido por el consumo de alimentos con niveles elevados de esta amina biógena. Se asocia comúnmente con el consumo de pescados escómbridos (atún, albacora, listado, bonito, caballa, etc.), de ahí el nombre “envenenamiento o intoxicación por escómbridos” con el que se le denomina frecuentemente debido a que fue donde primero se detectó. Sin embargo, la intoxicación histamínica también puede ser debida al consumo de pescados no escómbridos como anchoas, sardinas, arenques, etc., o de otros alimentos como quesos, productos cárnicos, vino, etc. Los síntomas que produce son de naturaleza básicamente neurológico-cutánea y gastrointestinal ejerciendo asimismo acción sobre el aparato cardiovascular, músculo liso y glándulas endocrinas.

La histamina es un producto secundario del metabolismo de ciertas bacterias que están presentes en el alimento, produciéndose dicha amina biógena por acción de la enzima histidin descarboxilasa, que transforma la histidina del músculo del pescado en histamina. Para evitar esta intoxicación y con el fin de prevenir la formación de histamina, es importante la detección e identificación rápidas de las bacterias responsables de producir ésta y otras aminas biógenas.

En este estudio se aplicó por vez primera la técnica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) con el fin de obtener los espectros de masas de las 16 principales bacterias productoras de aminas biógenas (mayoritariamente histamina) descritas a nivel internacional. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas bacterianas analizadas poseían perfiles espectrales específicos, lo que permitió su diferenciación inequívoca. Por medio de esta técnica también se identificaron picos comunes a ciertos grupos de bacterias. Así, dos picos de proteínas con masas 4182 ± 1 y 8363 ± 6 m/z resultaron estar presentes en todas las especies

de Enterobacterias analizadas excepto en *Morganella morganii*. Picos con masas 3635 ± 1 y 7267 ± 2 m/z resultaron asimismo específicos de *M. morganii* y *Proteus* spp. Las bacterias productoras de aminas biógenas pertenecientes al género *Proteus* exhibieron tres picos específicos de género en 3980, 7960 ± 1 y 9584 ± 2 m/z. El género *Photobacterium* también mostró tres picos específicos de género 2980 ± 1 , 4275 ± 1 y 6578 ± 1 m/z. Las dos bacterias Gram-positivas, *Lactobacillus* sp. 30A y *Staphylococcus xylosus*, mostraron un escaso número de picos de proteínas entre 2000-7000 m/z, pudiendo ser fácilmente diferenciables de las bacterias productoras de aminas biógenas Gram negativas. El análisis filoproteómico también mostró una buena correlación con respecto al análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S ADNr.

El enfoque descrito en este estudio abre el camino hacia la identificación rápida y específica de las principales bacterias productoras de aminas biógenas en base a marcadores proteicos, con el objetivo final de prevenir la intoxicación alimentaria asociada al consumo de alimentos con altos niveles de histamina.

Inmaculada C. Fernández-No¹
 Karola Böhme¹
 José M. Gallardo²
 Jorge Barros-Velázquez¹
 Benito Cañas³
 Pilar Calo-Mata¹

¹Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

²Department of Food Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), Higher Council for Scientific Research, Vigo, Spain

³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

Received October 2, 2009

Revised December 8, 2009

Accepted December 9, 2009

Research Article

Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting

Histamine poisoning is caused by the consumption of fish and other foods that harbor bacteria possessing histidine decarboxylase activity. With the aim of preventing histamine formation, highly specific mass spectral fingerprints were obtained from the 16 major biogenic amine-producing enteric and marine bacteria by means of MALDI-TOF MS analysis. All bacterial strains analyzed exhibited specific spectral fingerprints that enabled its unambiguous differentiation. This technique also identified peaks common to certain bacterial groups. Thus, two protein peaks at m/z 4182 \pm 1 and 8363 \pm 6 were found to be present in all Enterobacteriaceae species analyzed except for *Morganella morganii*. Peaks at m/z 3635 \pm 1 and 7267 \pm 2 were specific to both *M. morganii* and *Proteus* spp. Biogenic amine-forming *Proteus* spp. exhibited three genus-specific peaks at m/z 3980, 7960 \pm 1 and 9584 \pm 2. The genus *Photobacterium* also showed three genus-specific peaks at m/z 2980 \pm 1, 4275 \pm 1 and 6578 \pm 1. The two histamine-producing Gram-positive bacteria *Lactobacillus* sp. 30A and *Staphylococcus xylosus* exhibited a few protein peaks in the 2000–7000 m/z range and could be easily distinguished from biogenic amine-forming Gram-negative bacteria. Clustering based on MALDI-TOF MS also exhibited a good correlation with phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence, validating the ability of the MALDI-TOF technique to establish relationships between microbial strains and species. The approach described in this study leads the way toward the rapid and specific identification of major biogenic amine-forming bacteria based on molecular protein markers with a goal to the timely prevention of histamine food poisoning.

Keywords:

Biogenic amines / Histamine poisoning / MALDI-TOF / Microbial identification / Protein profiling
 DOI 10.1002/elps.200900591

1 Introduction

Biogenic amine formation in foods is due to the decarboxylation of specific free amino acids by the action of extracellular decarboxylases released by certain amine-producing bacteria [1]. Among these amines, histamine is the most biologically important in terms of its toxicological effect. Other biogenic amines, such as putrescine and cadaverine, derived from the decarboxylation of ornithine and lysine, respectively, may further enhance histamine toxicity by inhibiting the enzymes responsible for histamine metabolism, mainly histamine-N-methyltransferase and diamine oxidase [2], as well as the

binding of histamine to mucin, which normally leads to its degradation [3]. Although other food products like cheese, wine, fermented meats and fermented vegetables may also be involved in histamine poisoning, the consumption of fish containing high levels of histamine is the most frequent cause of the so-called “scombroid fish poisoning,” named for its association with scombroid fish species containing high levels of free histidine in muscle [4].

Several authors have isolated and identified major histamine-producing bacterial species from seafood (for a review: [5]) such as *Aeromonas hydrophila* from mackerel [6], *Staphylococcus xylosus* from salted semi-preserved anchovies [7], *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* and *Klebsiella pneumoniae* from tuna [8], as well as *Enterobacter aerogenes* [4], *Raoultella planticola* [9], *Photobacterium damsela* [10] and *Photobacterium phosphoreum* [11] from other fish species. Among them, *M. morganii* plays a crucial role in the production of histamine in scombroid fish, having been isolated from spoiled tuna and from other seafood products involved in incidents of scombroid poisoning [12, 13].

Correspondence: Professor Pilar Calo Mata, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain

E-mail: p.calo.mata@usc.es

Fax: +34-982252195

Likewise, *P. phosphoreum* was identified as the cause of histamine concentration in a case of poisoning caused by the consumption of sardine containing 1700 mg/kg of histamine [14]. In addition, species such as *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* have also been isolated from different fish species and identified as important histamine-producers [5], while *Lactobacillus* sp. 30A has been widely considered a significant histamine-producer in dairy products and wine [15]. In contrast to these prolific histamine-producers, *Stenotrophomonas maltophilia* is a weaker histamine-producer but a strong cadaverine producer. This bacterium, also isolated from seafood products, is known for its highly proteolytic and pathogenic nature, and as such, is a proposed microbial target in the prevention of biogenic amine formation in seafood [1, 16].

Several methods, mainly based on fluorometry, LC or CE, have been traditionally used for the detection and quantification of histamine and other biogenic amines in food [17, 18]. More recently, newer molecular methods based on DNA hybridization and PCR amplification have been used for the rapid and sensitive detection of certain biogenic amine-producing bacteria [19, 20], with a view to achieving the early detection and therefore prevention of histamine poisoning. However, these studies have been focused on a limited number of species and strains. Moreover, the results obtained by these methodologies may be complicated by the lack of genetic information on the microbial targets in the food product. Another problem is the potential inhibition of DNA polymerase by other food components and/or additives present in the DNA extract, which may lead to false negatives [21].

To circumvent these problems, advanced molecular tools based on MS analysis have already been proposed. The characterization of microorganisms by MALDI-MS was first described by Erhard *et al.* [22], reviewed and named intact cell MS by Ben [23], and reviewed again by Lay [24]. Thus, such new and robust methodologies based on protein analysis are gaining increasing importance as an alternative or complementary analytical approach for microbial identification. These approaches ensure rapid analysis, low cost, high accuracy and high sensitivity [25]. Accordingly, the aim of this work was to provide specific fingerprints of the major biogenic amine-producing bacteria involved in histamine poisoning by means of MALDI-TOF MS. Such data would represent a useful guide to allow the rapid detection and identification of histamine-producers in food products for the prevention and investigation of food poisoning outbreaks.

2 Materials and methods

2.1 Culturing of bacterial strains

The histamine-producing bacteria considered in this study were obtained from international culture collections or belonged to the mass spectral library of our laboratory

Table 1. Biogenic amine-producing bacterial species considered in this study

Bacterial strain	Code	GenBank	Reference
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	AmH01	CP000462	[6]
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	CiF01	FJ971857	[5]
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	EbA01	FJ971882	[4]
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	EbC11	FJ971883	[5]
<i>H. alvei</i> ATCC 9760	HaA02	FJ971884	[8]
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	KIPn21	FJ971886	[8]
<i>Lactobacillus</i> sp. 30A ATCC 33222	Lb30A	FJ971864	[15]
<i>M. morganii</i> BM 65 ^{a)}	MoM01	FJ971858	[8]
<i>P. damsela</i> ATCC 33539	PhD11	FJ971859	[10]
<i>P. phosphoreum</i> CECT ^{b)} 4172	PhP03	FJ971860	[11]
<i>P. vulgaris</i> ATCC 9484	PrV21	FJ971888	[5]
<i>P. mirabilis</i> ATCC 14153	PrM01	FJ971865	[5]
<i>R. planticola</i> ATCC 33531	KIP02	FJ971885	[9]
<i>S. xyloso</i> ATCC 29971	SyX11	FJ971865	[7]
<i>S. maltophilia</i> 25MC6 ^{c)}	StM01	FJ971861	[1, 16]
<i>S. maltophilia</i> 15MF ^{c)}	StM02	FJ971862	[1, 16]

a) Kindly given by Professor Teresa Mora-Ventura, Autonomous University of Barcelona, Spain.

b) CECT: Spanish Type Culture Collection.

c) Collection of the University of Santiago, Laboratory of Hygiene and Food Technology.

(Table 1). *A. hydrophila*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *H. alvei* and *S. maltophilia* were propagated at 30°C in Nutrient Agar (Oxoid, London, UK). *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *R. planticola*, *M. morganii*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* and *S. xyloso* were incubated at 37°C in Nutrient Agar (Oxoid). *P. damsela* and *P. phosphoreum* were routinely propagated at 25°C in Marine Agar (Oxoid), while *Lactobacillus* sp. 30A was grown at 37°C in Man, Rogosa and Sharpe medium (Oxoid). The code used in this study for each strain was assigned based on the genus and species (Table 1).

2.2 Genetic identification based on 16S rRNA gene amplification and sequencing

The strains were inoculated in Brain Heart Infusion broth (Oxoid) and incubated at 30°C for 18 h. Then the DNA was extracted and purified using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as described previously [26]. DNA concentration in the purified extracts was determined by fluorometry by means of the QUBIT™ method (Invitrogen, Paisley, UK). Bacterial amplification of the 16S rRNA gene was performed with the highly conserved 16S rDNA primer pair, p8FPL (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and p806R (5'-GGACTACCAGGTATCTAAT-3') [27, 28]. All amplification assays composed of 100 ng of template DNA, 25 µL of a master mix (BioMix, Bioline, London, UK) – this included the reaction buffer, dNTPs, magnesium chloride and Taq DNA polymerase – 25 pmol of each oligonucleotide primer and double-distilled water to achieve a final volume of 50 µL. Amplification conditions were as follows: an initial

denaturing step at 94°C for 7 min, followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 60 s), annealing (55°C for 60 s), extension (72°C for 60 s) and a final extension at 72°C for 15 min. All PCR assays were carried out in duplicate on a MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The PCR products were visualized by ethidium bromide staining of 2.5% horizontal agarose electrophoresis gels run at 100 V.

Prior to sequencing, the PCR products were purified by means of the ExoSAP-IT kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The same primers used for PCR were also employed for the sequencing of both strands of the PCR products, respectively. Sequencing reactions were analyzed in an automatic sequencing system (ABI 3730XL DNA Analyser, Applied Biosystems) provided with the POP-7 system. SNP events in DNA sequences were carefully reviewed by eye, using the Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia). Sequence alignment was accomplished using the CLUSTALW software [29]. Sequence homologies were found using the BLAST tool (National Centre for Biotechnology Information). Nucleotide sequences were compared and aligned amongst themselves and with respect to other sequences present in databases using CLUSTALW software [29]. Phylogenetic analyses were conducted using the MEGA software [30], using the neighbor-joining method [31] with 1000 bootstrap replicates to construct distance-based trees.

2.3 MALDI-TOF MS fingerprinting

For MALDI-TOF MS analysis, the bacterial strains were grown on Plate Count Agar (PCA, Oxoid) and incubated for 24 h at 30°C. When required, bacteria were alternatively grown in Marine Agar (Oxoid) or Man, Rogosa and Sharpe Agar (Oxoid). One loopful of each bacterial culture, prepared by collecting the biomass of a few number of bacterial colonies, was harvested in 100 µL of a solution of 50% ACN (Merck, Darmstadt, Germany) and 1% aqueous TFA (Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA) and mixed by vortexing. After centrifugation at 8000 × g for 10 min, the supernatant was transferred to a new tube and stored frozen at –20°C until analysis. A 1-µL aliquot of each sample solution was mixed with 10 µL matrix solution composed of saturated α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid in 50% ACN and 2.5% aqueous TFA. From this final solution of sample and matrix, a 1-µL aliquot was manually deposited onto a stainless steel plate and allowed to dry at room temperature.

Mass spectra were obtained using a Voyager DE STR MALDI-TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems) operating in linear mode, extracting positive ions with an accelerating voltage of 25 000 V and delay time of 350 ns. Grid voltage and guide wire were set to 95 and 0.05%, respectively. Each spectrum was the accumulated sum of at least 500 laser shots, obtained in five different regions manually selected of

the same sample spot, in a range of 1500–15 000 Da. For each sample two extractions were carried out and both extracts were measured in duplicate, thus giving four spectra for each bacterial strain. All spectra were calibrated using an external protein calibration mixture (insulin chain B oxidized and bovine insulin) (Sigma, Barcelona, Spain) and analyzed with the DataExplorer[®] Software (Version 4.0.0.0). Mass spectra were baseline-corrected, noise-filtered and data lists containing m/z values were extracted from mass spectral data, including signals with relative intensities above 2%. Obtained peak lists were analyzed and compared using peaks in the mass range of 2000–10 000 Da, due to the good reproducibility of the spectral profile in that mass range. Peaks with masses above 10 000 Da could rarely be observed, showed poor reproducibility, and also exhibited wide peak amplitudes and high mass errors.

Mass lists were further processed with the free available web program-based application SPECLUST available at <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> [32]. The web interface is based on the determination of the mass difference between two peaks taken from different peak lists, and calculates whether two peaks are identical by taking into account a certain measurement uncertainty (σ) and peak match score (s). The peak match score represents the probability that two peaks with measured masses “ m ” and “ m' ” have a mass difference equal or larger than $|m - m'|$, given that the mass difference is only due to measurement errors [32]. Since each bacterial strain was cultured by duplicate and each culture was analyzed by duplicate, this tool was used to examine the four spectra from each sample, extracting representative peaks that are present in all four spectra, taking into account a peak match score larger than 0.7 corresponding to a measurement error of ± 5 Da. Arithmetic means were calculated for m/z values and SDs were less than 5 Da in the mass range above 7000 Da and less than 3 Da in the lower mass range. According to these specifications, specific mass lists, including 5–35 peak masses, were generated for every bacterial strain, representing reproducible bacterial fingerprints.

Likewise, strain-specific peak lists were compared with each other using the SPECLUST tool to identify characteristic biomarkers either at the species or genus levels. For this analysis, the peak lists of each strain were compared and distances between peak pairs calculated as described in the previous paragraph. A peak was considered to be common to two spectra if the peak match score was larger than 0.7 corresponding to a width in peak match score of 10 Da.

Finally, mass lists of all species were clustered using the clustering option, also available in the web interface SPECLUST. The agglomerative clustering method created one cluster for every peak list and calculated distances between clusters. The two closest clusters, in this study the two clusters with the smallest maximum pairwise distance (complete linkage), were then merged into a new cluster and the distances were calculated again. This process was repeated until one single cluster remained. To calculate distances between two peak lists, all individual similarity

scores of every pair of the two peak lists were added up [32]. Width in peak match score was set to 10 Da.

3 Results

3.1 Genetic identification of biogenic amine-producing bacteria by 16S rRNA analysis

All 16 biogenic amine-producing strains considered in this work were first subjected to genetic fingerprinting by means of universal primers targeted to 16S rRNA gene. This genetic data serves as a reference for other amine-producing microbial strains isolated from spoiled seafood and other food products, as well as for comparison purposes with the protein fingerprints obtained for each bacterial strain by MALDI-TOF MS analysis.

A phylogenetic tree of all 16 biogenic amine-producing bacteria was constructed based on their 16S rRNA sequences (Fig. 1). While both Gram-positive bacteria (*S. xylosus* and *Lactobacillus* sp. 30A) clustered in a single branch, Gram-negative bacterial strains belonging to the family Enterobacteriaceae clustered together in one group while other Gram-negatives such as *A. hydrophila*, *P. phosphoreum*, *P. damsela* and *S. maltophilia* clustered in a separate group. As expected, species of the genus *Photobacterium* grouped together, a result that was also observed for *S. maltophilia* strains. Likewise, in the branch of the Enterobacteriaceae family, *M. morganii* and *Proteus* spp. were located in a subgroup separated from the other species.

3.2 Analysis of biogenic amine-producing bacteria by MALDI-TOF MS

Mass spectra of bacteria provided specific spectral fingerprints that enabled the grouping of species easily. One

group included all biogenic amine-producing species belonging to the Enterobacteriaceae family, which presented similar spectral profiles with regard to the number and intensity of peaks (Figs. 2 and 3). The similarities found in their spectrometric profiles made it difficult to differentiate these species by simply viewing the profiles. However, the analysis of their mass lists revealed differences in the masses of related peaks at the species level. The relationships between the masses of characteristic peaks for these species are summarized in Table 2. Remarkably, at least two species-specific peaks with a high intensity were observed for each species, while two small but representative peaks (m/z 4182 ± 1 and 8363 ± 6) were found to be present in all Enterobacteriaceae species analyzed except for *M. morganii* (MoM01), which presented related peaks with masses of m/z 4169 and 8328 (Fig. 3).

In general terms, the spectra of EbA01, EbC11, KIPn21, KIP02 and CiF01 were all very similar (Fig. 2), sharing the most intense peak at a mass of m/z 4361 ± 1 as well as a peak at m/z 2181 ± 1 . The peak of mass m/z 6377 ± 2 was common to all species compiled in Fig. 2 except for *E. cloacae*, the latter strain exhibiting a species-specific peak at m/z 6447. Species belonging to *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Raoultella* shared several peaks, such as those corresponding to 3577 ± 1 , 3618 ± 3 , 7152 ± 2 , 7238 ± 1 and m/z 9129 ± 6 values. In contrast, *C. freundii* (CiF01) exhibited related peaks but with a mass shift, and some of these peak masses were also found in *H. alvei* (Fig. 3), for example, the peaks with masses of m/z 3543 ± 1 and 7084 ± 1 .

The mass spectrometric profiles shown in Fig. 3 are similar to those of other Enterobacteriaceae species presented in Fig. 2, but the former showed certain differences in the arrangement and masses of the peaks compared with the latter. Interestingly, the peak of mass m/z 5130 ± 3 appeared in the spectra of all species shown in Fig. 3. *H. alvei* and *M. morganii* shared peaks at m/z 2187 ± 2 and 4371 ± 3 , while the peaks of m/z 3635 ± 1 and 7267 ± 2

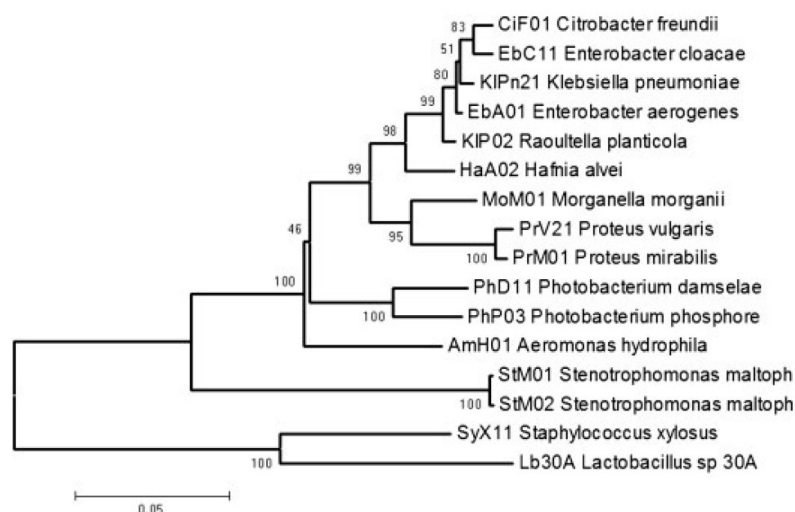


Figure 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequences of biogenic amine-producing bacteria using the neighbor-joining method. Numbers above and below branches indicate bootstrap values from neighbor-joining analysis.

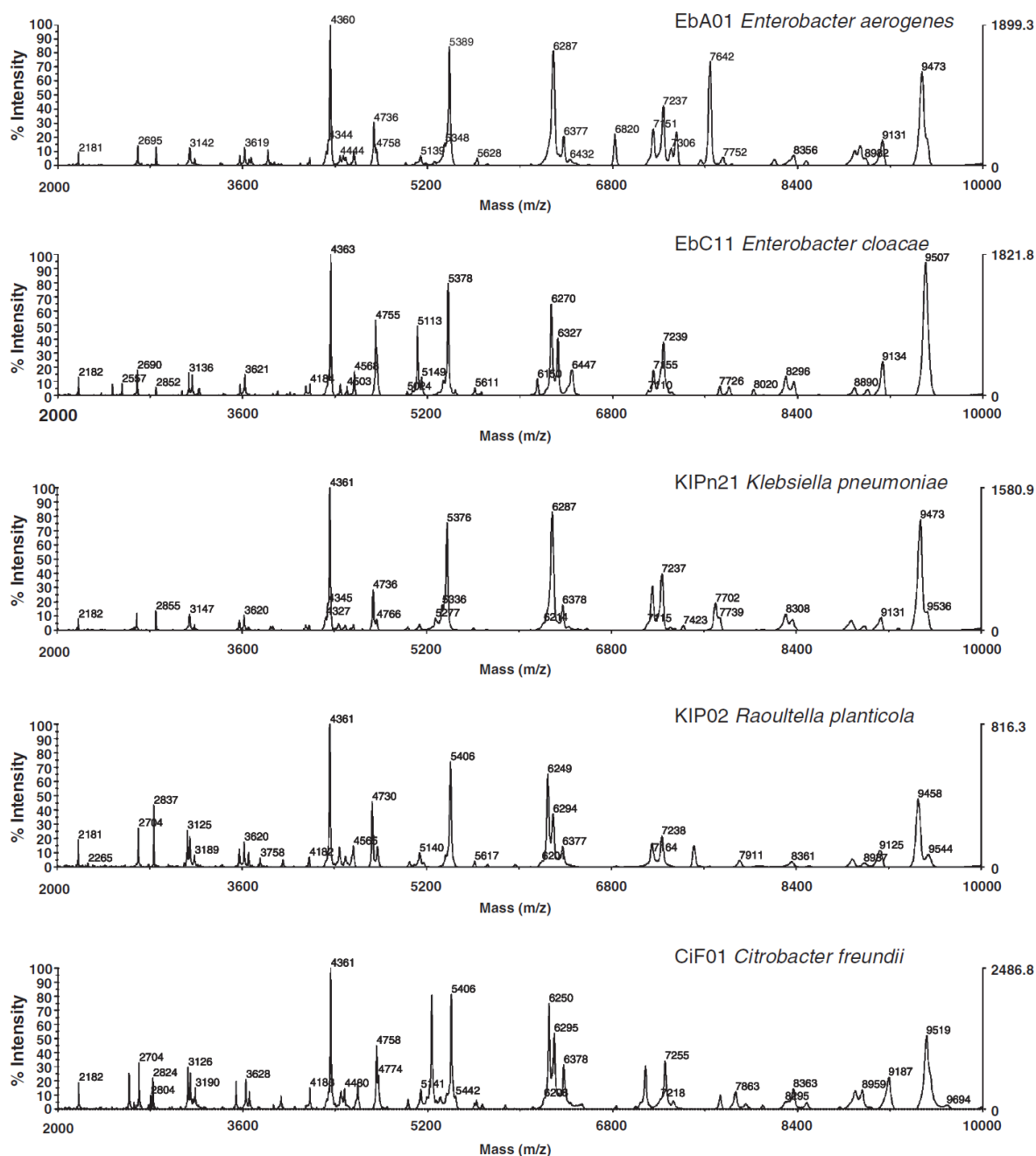


Figure 2. Mass spectrometric profiles of biogenic amine-producing Enterobacteriaceae. Species shown are *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. cloacae* ATCC 13047, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *R. planticola* ATCC 33531 and *C. freundii* ATCC 13048.

appear to be specific to both *M. morganii* and *Proteus* spp. (Fig. 3). The two spectra obtained for the *Proteus* spp. (PrM01, PrV21) ended up being very similar, exhibiting several peak masses in common (m/z 2825 \pm 1, 3555 \pm 4, 4792 \pm 4 and 9470 \pm 3) as well as three genus-specific peaks at m/z 3980, 7960 \pm 1 and 9584 \pm 2. In addition, some species-specific peaks were also observed for *P. mirabilis* and *P. vulgaris* (Fig. 3).

A characteristic peak present in all species of Enterobacteriaceae displayed a mass of m/z 5376 \pm 1 in the spectra of EbC11, KIPn21 and MoM01, a mass of m/z 5390 \pm 2 in the spectra of EbA01 and HaA02, a mass of m/z 5406 \pm 1 for KIP02 and CiF01, and appeared as two peaks at m/z 5492 and 5507 for PrM01 and PrV21, respectively. Similarly, we found two other characteristic peaks present in all spectra with masses in the m/z 6210–6290 and

Table 2. Characteristic mass peaks of biogenic amine-forming Enterobacteriaceae and relationships among each other

Bacterial strain								
PrM01	PrV21	MoM01	HaA02	CiF01	EbA01	EbC11	KIPn21	KIP02
–	–	–	–	–	–	–	–	–
2235	2242	2187 ± 2	–	2181 ± 1	2181 ± 1	–	2181 ± 1	–
–	–	–	–	2619	–	–	–	–
2824 ± 1	–	–	2810	2824 ± 1	2854 ± 1	–	2854 ± 1	2837
2995	–	3174	–	–	–	–	–	–
–	–	3238	–	–	–	–	–	–
3556 ± 4	–	3587	3543 ± 1	–	3577 ± 1	–	3577 ± 1	–
3635 ± 1	–	3635 ± 1	3618 ± 3	3629	3618 ± 3	–	3618 ± 3	–
3980 ± 1	–	–	3887	–	3821	–	–	3658
4182 ± 1	–	4167	4182 ± 1	–	4182 ± 1	–	4182 ± 1	–
4469	4480	4371 ± 3	–	4361 ± 1	4361 ± 1	–	4361 ± 1	–
5130 ± 3	–	5130 ± 3	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	5236,0	–	5112	–	–
5492	5507	5376 ± 1	5390 ± 2	5406 ± 1	5390 ± 2	5376 ± 1	5376 ± 1	5406 ± 1
6250 ± 1	6268 ± 1	6210	6250 ± 1	–	6287 ± 1	6268 ± 1	6287 ± 1	6250 ± 1
–	–	–	–	–	–	6325	–	–
6473 ± 2	6501	6473 ± 2	6393	6377 ± 2	–	6447	6377 ± 2	–
–	–	–	–	–	6820	–	–	–
7113	7103	7171	7084 ± 1	–	7152 ± 2	–	7152 ± 2	–
7267 ± 2	–	7267 ± 2	7228	7256	7238 ± 1	–	7238 ± 1	–
7825	7812	–	7771	–	7642	–	7702	7516
–	–	–	–	–	–	–	–	7909
7960 ± 1	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	8308	–
8363 ± 6	–	8328	8363 ± 6	–	8363 ± 6	–	8363 ± 6	–
–	–	8662	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	9187	9129 ± 6	–	9129 ± 6	–
–	–	9270	–	–	–	–	–	–
9472 ± 4	–	9455 ± 3	9550	9520	9472 ± 4	9505	9472 ± 4	9455 ± 3
9584 ± 2	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	9640	–	–	–	–	–

Peak masses are presented as m/z values. Species-specific peaks are highlighted in bold face; genus-specific peaks in bold and italics.

9450–9550 ranges, but without any significance at the genus or species level. Table 2 compiles all the characteristic peaks of all nine biogenic amine-producing Enterobacteriaceae with special references to genus-specific and species-specific peak masses.

Spectrometric profiles of non-enteric biogenic amine-producing Gram-negatives are compiled in Fig. 4. The spectra of the two strains of *S. maltophilia* were found to be similar to the spectra of Enterobacteriaceae with regard to the arrangement and intensity of peaks, but peak masses were notably different. Thus, up to eight species-specific peaks for *S. maltophilia* were observed. The spectra of both *S. maltophilia* strains tested proved to be nearly identical and the only strain-specific peaks observed had masses of m/z 6065 and 2095 for strains StM01 and StM02, respectively (Fig. 4). Other non-enteric bacteria compiled in Fig. 4 showed species-specific profiles remarkably different to those observed for Enterobacteriaceae, thus allowing their differentiation based on the number, arrangement and intensity of peaks. *A. hydrophila* exhibited eight species-

specific peaks, with only two peaks of masses m/z 2132 ± 2 and 6096 ± 1 that were common to other non-enteric bacteria (Fig. 4). Likewise, spectra of PhD11 and PhP03, both of them belonging to the genus *Photobacterium*, evidenced a high number of common peaks and, remarkably, three genus-specific peaks at m/z 2980 ± 1, 4275 ± 1 and 6578 ± 1 (Table 3). Table 3 summarizes all the characteristic peaks of all five non-enteric biogenic amine-producing Gram-negative bacteria with special references to genus-specific and species-specific peak masses.

Figure 5 shows the spectra of the two major histamine-producing Gram-positive bacteria considered in this study; these were *Lactobacillus* sp. 30A and *S. xylosus*. The layout of the mass spectrometric profiles of these species was found to be significantly different to those observed in the 14 Gram-negative bacteria considered in this work. Thus, only a few peaks were observed in the m/z 2000–7000 range, and no peak above 7000 Da was observed in Lb30A and SyX11. In the spectra corresponding to Lb30A five of the mass

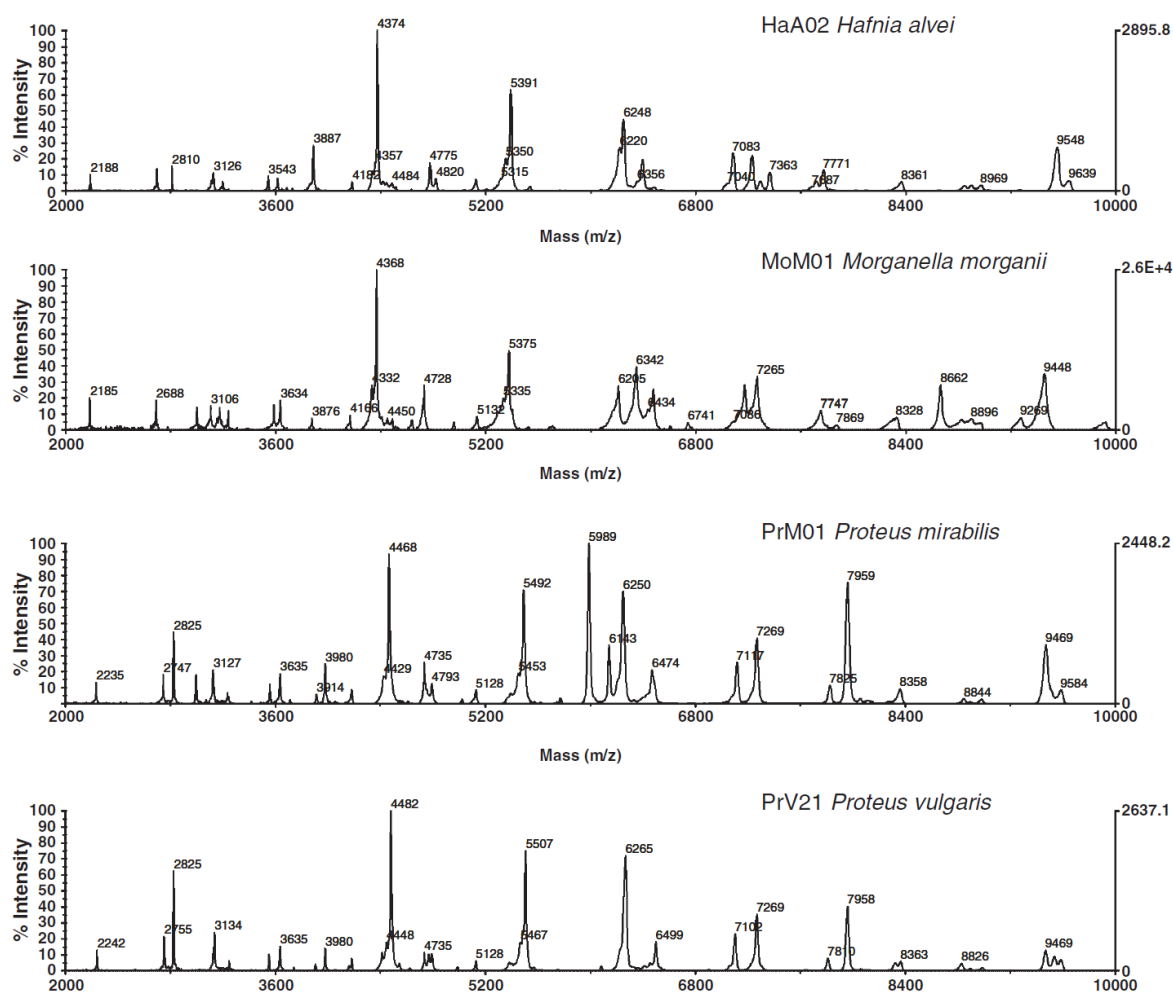


Figure 3. Mass spectrometric profiles of biogenic amine-producing Enterobacteriaceae. Species shown are *H. alvei* ATCC 9760, *M. morganii* BM 65, *P. vulgaris* ATCC 9484 and *P. mirabilis* ATCC 1415.

peaks were specific for this species, while a small peak at $m/z\ 2793 \pm 2$ was also found in SyX11 but did not appear in the spectra of any of the Gram-negative bacteria investigated. More peaks were found in *S. xylosus*, most of them proving to be species-specific. Table 4 summarizes the masses of the peaks for Lb30A and SyX11 with special references to species-specific peaks.

A dendrogram of elaborated mass lists was prepared for all 16 biogenic amine-producing strains (Fig. 6). Since clustering is based on the mass spectral relationships of proteins, the clustering was performed and compared to the phylogenetic analysis based on the 16S rRNA nucleotide sequences. Gram-positive bacteria, including *Lactobacillus* sp. 30A and *S. xylosus* could be separated from the cluster of Gram-negative bacteria according to protein profiling (Fig. 6). In addition, the *A. hydrophila* and both *S. maltophilia* strains were placed in a branch detached from other species belonging to the family Enterobacter-

iaceae, the latter strains forming another cluster together with species of the genus *Photobacterium* (Fig. 6). Cluster analysis demonstrated that the spectra of the *Proteus* spp. investigated were more similar to those belonging to the genus *Photobacterium* than to the other species belonging to family Enterobacteriaceae. Within this cluster, *K. pneumoniae*, *R. planticola* and *Enterobacter* spp. were grouped together, while *C. freundii* and *H. alvei* constituted a separate group. Close relationships at the M_r level between 2 and 10 kDa were observed between *K. pneumoniae* and *E. aerogenes*, but also between both *Proteus* species tested. Comparing the protein profiling cluster analysis with the phylogenetic tree, relevant similarities were observed in terms of separating Gram-positive from Gram-negative biogenic amine-producing strains. Moreover, both tools allowed the grouping of members of the Enterobacteriaceae family in a cluster well separated from non-enteric bacteria.

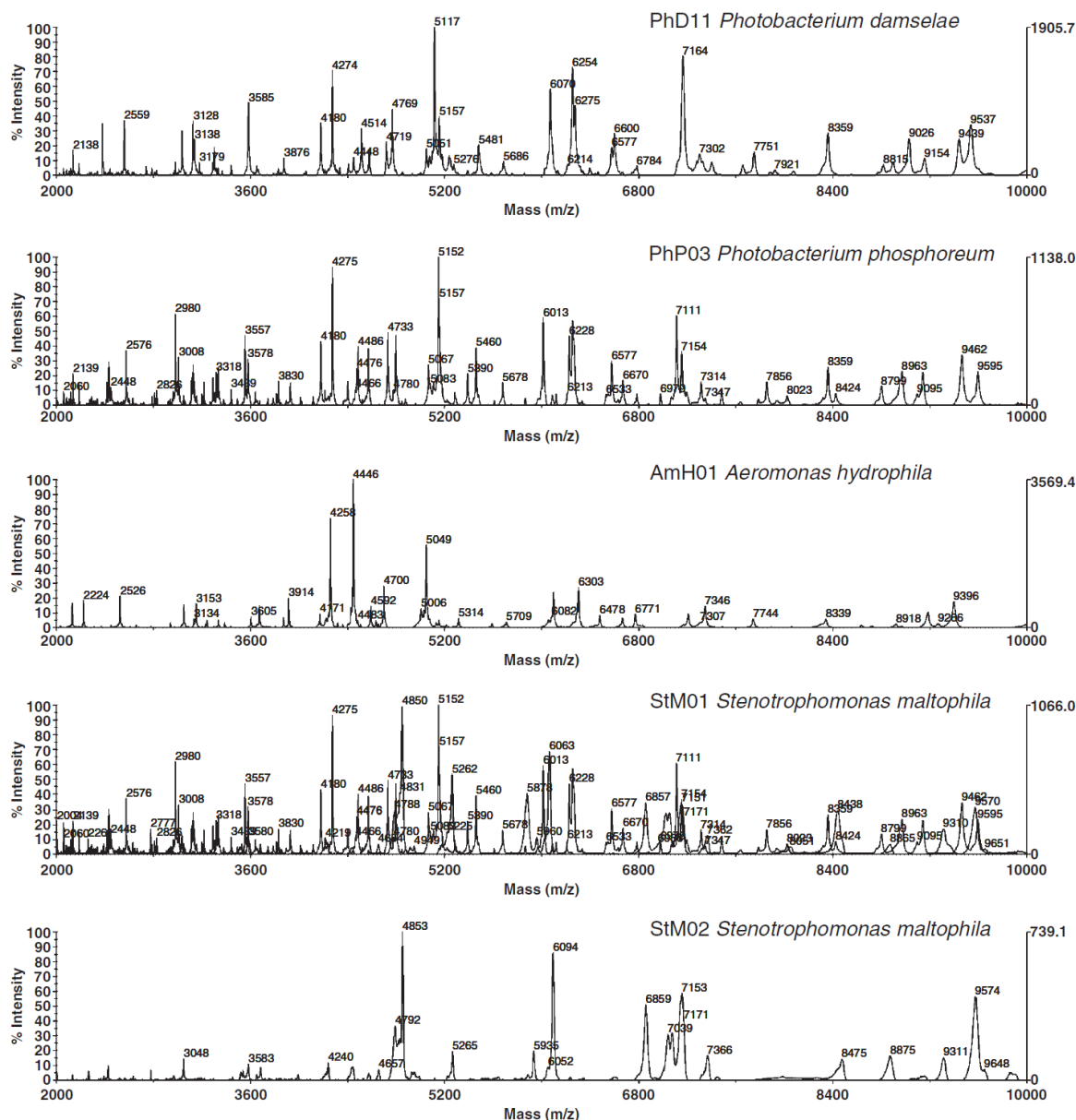


Figure 4. Mass spectrometric profiles of non-enteric biogenic amine-producing Gram-negative bacteria. Species shown are *P. damsela* ATCC 33539, *P. phosphoreum* CECT 4172, *A. hydrophila* ATCC 7966, *S. maltophilia* 25MC6 and *S. maltophilia* 15MF.

4 Discussion

Histamine poisoning represents an important health risk for consumers and is linked with the consumption of fresh or processed foods in which major biogenic amine-producing bacteria have proliferated. The consumption of high levels of histamine can cause nausea, respiratory alterations, sweats, throbs, headaches, skin reddening and hyper- or hypotension. However, histamine alone is unlikely to be the causative agent of such poisoning [33]. It is believed that the

presence of other biogenic amines, like putrescine and cadaverine, which are not considered to be toxic in healthy individuals, can promote the toxic effects of histamine. The non-hygienic handling of fresh food and the delay in establishing refrigeration conditions notably facilitates the growth of pathogenic bacteria. Scombroid fish, such as tuna, mackerel, bonito and saury, contain high levels of free histidine in their muscle and therefore are often implicated in scombroid fish poisoning. However, several species of non-scombroid fish such as mahi-mahi, bluefish, herring

Table 3. Characteristic mass peaks of biogenic amine-forming *Enterobacteriaceae* and relationships among each other

Bacterial strain				
StM01	StM02	PhD11	PhP03	AmH01
	2132 ± 2	2139 ± 1		2132 ± 2
	2264 ± 2	2381	—	—
—	—	2558	2577	2526
	2778 ± 1	2980 ± 1	—	—
—	—	3129 ± 1	—	—
—	—	—	3555	—
	3581 ± 2	3581 ± 2	—	—
	3684 ± 1	—	—	3673
—	—	—	—	3911
—	—	4182 ± 1	—	4169
	4239 ± 1	4275 ± 1	—	4255
—	—	4515	4573	4445
	4790 ± 3	4771	4734	4699
	4852 ± 1	—	4801	—
	5265 ± 2	5118	5153	5048
	5883 ± 2	5482	5463	—
6065	6096 ± 1	6071	6015	6096 ± 1
—	—	6257 ± 2	—	6301,1
	6859 ± 1	6578 ± 1	—	—
—	—	—	7113	—
	7156 ± 2	7163,1	7156 ± 2	7205
—	—	—	7858	7743
—	—	8361 ± 2	—	8338
—	—	9026	8967	—
—	—	9443	9470	9395
	9574 ± 2	9539	9598	—

Peak masses are presented as m/z values. Species-specific peaks are highlighted in bold face; genus-specific peaks in bold and italics.

incident caused seven victims to become ill, all suffering symptoms that were allergy-like, such as rash, nausea, diarrhea, flushing, and tingling and itching of skin, but all recovered within 24 h.

A significant number of bacterial species are known to possess histidine decarboxylase and have the ability to produce histamine. Among these, the species studied in this study represent the major histamine producers in fish, seafood, cheese and other food products described in the scientific literature to date. For this reason, the presence of these bacterial species in fish and other food products implies the risk of accumulating toxic levels of histamine and the subsequent negative consequences in consumer health. Accordingly, with a view to preventing histamine poisoning and to ensuring the safety of fish and other food products, it is important to detect and identify bacterial species that are responsible for histamine accumulation in a rapid and specific way.

A considerable amount of work has focused on the determination of histamine levels and the identification of histamine-producing bacteria in foodstuffs. In this way, microbiological, biochemical, enzymatic, chromatographic and genetic approaches have been used to achieve these aims. Among the microbiological and genetic methods aimed at the early detection of histamine-forming bacteria in foods, the Niven medium has been widely used for isolation of histamine-producing bacteria [34, 35]. Although useful as a screening tool, this method may lead to false positives, thus requiring a confirmation technique such as HPLC, with the confirmed bacteria requiring a further phenotypic microbial identification. On the other hand, genetic techniques such as dot-blot hybridization [16] and PCR-based detection of the 16S rRNA gene [5] or the histidine decarboxylase gene [19], have been recently developed

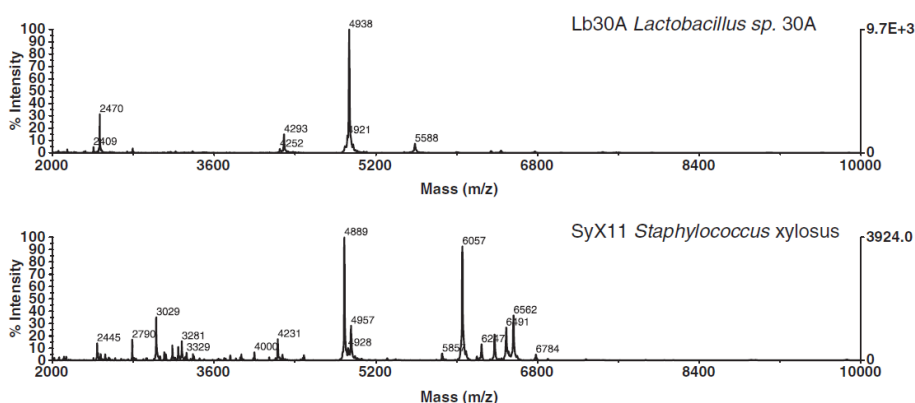


Figure 5. Mass spectrometric profiles of biogenic amine-producing Gram-positive bacteria. Species shown are *Lactobacillus* sp. 30A ATCC 33222 and *S. xylosus* ATCC 29971.

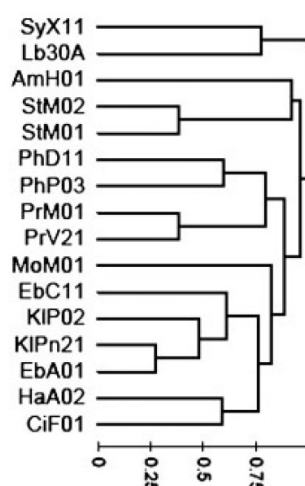
and sardine, as well as other foods, have also been implicated in histamine poisoning incidents [33]. Probably the most recent case was a food-borne poisoning event caused by ingestion of tuna dumplings, occurring in Chiay Prefecture, Southern Taiwan, in March 2006 [33]. This

to improve the timing and sensitivity of analysis. More recently, Q-PCR has complemented conventional PCR, making it possible to quantify the histamine-producing bacteria in fish, therefore reducing the detection time with the aim of producing a rapid response to prevent histamine

Table 4. Characteristic mass peaks of biogenic amine-forming Gram-positive bacteria and relationships among each other

Bacterial strain	
SyX11	Lb30A
–	2409
2446	2470
2793 ± 2	
3032	–
4001	–
4232	4293
4890	–
4958	4938
6056	5589
6377	–
6492	–
6563	–

Peak masses are presented as m/z values. Species-specific peaks are highlighted in bold face.

**Figure 6.** Biogenic amine-producing bacteria cluster analysis based on MALDI-TOF-MS data. The scale below the dendrogram indicates the relative distance used in the clustering, as described in Section 2.

poisoning [20]. Nevertheless, one drawback of these genetic techniques is that they require genetic knowledge of the histamine-forming bacteria that may be present in the food sample, to allow identification. In addition, PCR-based methods may also be inhibited by certain food components or additives present in the DNA extract, which may lead to false-negative results.

This scenario prompted us to apply a robust and updated molecular tool, MALDI-TOF MS analysis, to achieve the rapid and specific identification of the major histamine-producing bacteria responsible for histamine poisoning in foods, as described in the literature. Meth-

odologies based on the analysis of proteins represent a complementary alternative to the genomic approach, since they require short analysis time, have a low cost and also exhibit high precision and sensitivity. For these reasons, several authors have described the application of protein profiling by MALDI-TOF MS for the identification of bacterial species, mainly human pathogens, by means of MS techniques [36, 37]. MALDI-TOF-MS has been used for bacterial identification and represents a rapid technique due to the simple preparation of samples and the possibility of analyzing whole bacterial cells [38, 22]. One report described the usefulness of MALDI-TOF MS for bacterial identification of pathogenic and non-pathogenic food-borne bacteria [22]. Other authors have provided useful spectra derived from *Listeria* spp. isolates that showed characteristic peaks, conserved at both the species and lineage levels [39].

This study paid special attention to the reproducibility and significance of the mass peaks selected as representative of each major histamine-forming bacteria. For it, each bacterial strain considered in this work was cultured by duplicate and each duplicated was analyzed by MALDI-TOF-MS by duplicate. This strategy was aimed at checking the reproducibility of bacterial growth and sample preparation. Accordingly, four spectra were obtained for each biogenic amine-forming strain. A careful analysis of the four spectra obtained for each bacterial strain allowed the selection of only peak masses that were present in all four spectra. Thus, this strategy ensured that the selected peaks were unambiguously characteristic of each bacterial strain. Moreover, arithmetic means for m/z values were calculated from each set of four spectra, giving mass variations lower than ± 5 Da in the mass range above 7000 Da and lower than ± 3 Da in the lower mass range. These results underlined the reliability and reproducibility of the whole protocol of biological culture of strains, extraction and MS analysis.

In this sense, previous studies have discussed the influence of various parameters, such as bacterial culture conditions, growth phase or sample preparation protocol on the reproducibility of MALDI-TOF-MS profiles. While the methodology of sample preparation has been reported to be especially critical to obtain reproducible and comparable mass spectra by MALDI-TOF analysis [25, 40], the nature of the culture medium has been reported to exert fewer effects on the reproducibility of mass spectra [40]. For it, in this work a strict standard protocol was followed and reproducible mass spectra were obtained.

Although proteomic tools have been recently used for the definition of microbial biomarkers at either genus, species or even strain level [41–45], to the best of our knowledge, MS tools have not been used to provide spectra that may contribute to the direct identification of histamine-producing bacteria of relevance to food safety. Accordingly, in this study we considered the most relevant microbial species involved in histamine poisoning according to the scientific literature. To this end, the intensive study of mass lists provided the identification of a number of characteristic peaks that may accurately serve as references for the identification of unknown bacterial strains.

Likewise, genus-specific and species-specific peaks were observed, and these are sufficient to distinguish the species analyzed unambiguously. The application of the web interface SPECLUST also allowed the clustering of mass lists and the construction of a clustering tree using the spectrometric masses of the major biogenic amine-producing species. Remarkably, clustering exhibited good correlation with respect to phylogenetic analysis. Moreover, the dendrogram constructed with mass peaks data revealed this method to be a rapid and robust way to compare and discriminate bacterial spectral profiles. The usefulness of such methods is that any unknown bacterial mass spectra can be added and classified with the mass lists present in the mass spectral library provided in this study, thus facilitating its identification.

In summary, this study permitted the rapid and specific identification of major bacteria responsible for histamine poisoning mediated by the consumption of fish and other food products. Protein mass profiles provided highly specific fingerprints that made it possible to differentiate all the species considered. The mass spectral library provided in this work will serve as a reference for the identification of the microorganisms involved in histamine poisoning and help to prevent this syndrome. However, this mass spectral library should be enlarged in the future with the incorporation of other histamine-forming bacteria.

The authors thank Dr. Francisco Barros (Unidad de Medicina Molecular, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela) for his excellent technical assistance with the 16S rRNA sequencing. This work was funded by the PGIDIT Research Program (Project PGIDIT06P-XIB261164PR) of the Xunta de Galicia (Galician Council for Industry Commerce and Innovation).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J. M., Villa, T. G., Barros-Velázquez, J., *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 57, 19–31.
- [2] Stratton, J. E., Taylor, S. L., in: Ward, D. R., Hackney, C. (Eds.), *Microbiology of Marine Food Products*, Avi Publishing Co., Van Nostrand Reinhold, NY 1991, pp. 331–351.
- [3] Chu, C., Bjeldanes, L. F., *J. Food Sci.* 1981, 47, 79–80, 88.
- [4] Taylor, S. L., *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1986, 17, 91–128.
- [5] Kim, S. H., Barros-Velázquez, J., Ben-Gigirey, B., Eun, J. B., Jun, S. H., Wei, C. I., *Food Sci. Biotechnol.* 2003, 12, 451–460.
- [6] Middlebrooks, B. L., Toom, P. M., Douglas, W. L., Harrison, R. E., McDowell, S., *J. Food Sci.* 1988, 53, 1024–1029.
- [7] Rodríguez-Jerez, J. J., Mora-Ventura, M. T., López-Sabater, E. I., Hernández-Herrero, M., *J. Food Prot.* 1994, 57, 784–787, 791.
- [8] Taylor, S. L., Speckhard, M. W., *Mar. Fish. Rev.* 1983, 45, 35–39.
- [9] Taylor, S. L., Guthertz, L. S., Leatherwood, M., Lieber, E., *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37, 274–278.
- [10] Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Fujii, T., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994, 44, 631–636.
- [11] Morii, H., Cann, D. C., Taylor, L. Y., *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988, 54, 299–305.
- [12] Eitenmiller, R., Wallis, J., Orr, J., Philips, R., *J. Food Prot.* 1981, 44, 815–820.
- [13] Ababouch, L., Afilal, M. E., Rhafiri, S., Busta, F., *Food Microbiol.* 1991, 8, 127–136.
- [14] Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T., *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 92, 79–87.
- [15] Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barelllo, C., Conti, A., Giunta, C., *Proteomics* 2005, 53, 687–698.
- [16] Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J. M., Kim, S. H., An, H., Villa, T. G., Barros-Velázquez, J., *Food Control* 2002, 13, 293–299.
- [17] Sotelo, C. G., Gallardo, J. M., Piñeiro, C., Pérez-Martin, R., *Food Chem.* 1995, 53, 61–65.
- [18] Cinquina, A. L., Longo, F., Cali, A., De Santis, L., Baccelliere, R., Cozzani, R., *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 79–85.
- [19] Marcobal, A., De Las Rivas, B., Muñoz, R., *J. Consum. Prot. Food Saf.* 2006, 1, 187–196.
- [20] Fernández, M., Del Río, B., M. Linares, D., Martín, M. C., Álvarez, M. A., *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 3763–3769.
- [21] Prado, M., Calo, P., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 2918–2926.
- [22] Erhard, M., von Döhren, H., Jungblut, P., *Nat. Biotechnol.* 1997, 15, 906–909.
- [23] Ben, L. M. B., *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24, 193–219.
- [24] Lay, J. O., Jr., *Mass Spectrom. Rev.* 2001, 20, 172–194.
- [25] Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A., Siciliano, R. A., *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 1180–1189.
- [26] Hosseini, S. V., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., *J. Appl. Microbiol.* 2009, 107, 1392–1403.
- [27] Relman, D. A., Schmidt, T. M., MacDermott, R. P., Falkow, S., *N. Engl. J. Med.* 1992, 327, 293–301.
- [28] Angert, E. R., Clements, K. D., Pace, N. R., *Nature* 1993, 362, 239–241.
- [29] Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 4673–4680.
- [30] Kumar, S., Nei, M., Dudley, N., Tamura, K., *Brief. Bioinform.* 2008, 9, 299–306.
- [31] Saito, N., Nei, M., *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406–425.
- [32] Alm, R., Johansson, P., *J. Proteome Res.* 2006, 54, 785–792.
- [33] Hwi-Chang, C., Hsien-Feng, K., Wen-Chieh, C., Wen-Feng, L., Deng-Fwu, H., Yi-Chen, L., Yung-Hsiang, T., *Food Chem.* 2008, 106, 612–618.
- [34] Niven, C. F., Jeffrey, M. B., Corlett, D. A., *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 321–322.

Electrophoresis 2010, **31**, 1116–1127

General 1127

- [35] Yoshinaga, D., Frank, H., *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, **44**, 447–452.
- [36] Lynn, E. C., Chung, M.-C., Tsai, W.-C., Han, C.-C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, **13**, 2022–2027.
- [37] Ruelle, V., Moualij, B. E., Zorzi, W., Ledent, P., Pauw, E. D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, **18**, 2013–2019.
- [38] Smole, S. C., King, L. A., Leopold, P. E., Arbeit, R. D., *J. Microbiol. Methods* 2002, **48**, 107–115.
- [39] Sukhdeo, B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, **74**, 5402–5407.
- [40] Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., Wahl, K. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 58–64.
- [41] Holl, R. D., Rafii, F., Heinze, T. M., Sutherl, J. B., Voorhees, K. J., Lay, J. O., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, **14**, 911–917.
- [42] Pineda, F. J., Antoine, M. D., Demirev, P. A., Feldmann, A. B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J. S., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 3817–3822.
- [43] Demirev, P. A., Feldmann, A. B., Lin, J. S., *Johns Hopkins Appl. Technic. Digest.* 2004, **25**, 27–37.
- [44] Sun, L., Teramoto, K., Sato, H., Torimura, M., Tao, H., Shintani, T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, **20**, 3789–3798.
- [45] Fagerquist, C. K., *J. Proteome Res.* 2007, **67**, 2539–2549.

3.3. CAPÍTULO 3

Aislamiento y caracterización de *Streptococcus parauberis* aislado de un producto marino refrigerado y envasado al vacío

Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaging refrigerated seafood products

I.C. Fernández-No, K. Böhme, P. Calo-Mata, B. Cañas, J.M. Gallardo, J. Barros-Velázquez

Publicado en *Food Microbiology* (Disponible online desde el 25 Octubre del 2011)

RESUMEN

Streptococcus parauberis es un agente etiológico de mastitis en vacas y también de estreptococosis en peces de acuicultura, aunque su presencia en alimentos rara vez se ha observado. En este trabajo, dos aislados bacterianos se recuperaron de un producto elaborado a base de pescado envasado al vacío y refrigerado. Ambas cepas fueron identificadas por secuenciación del gen 16S ADN_r, mostrando una homología del 99% con respecto a *S. parauberis*, siendo asimismo caracterizadas mediante MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). El análisis genético reveló la homogeneidad clonal de los aislamientos y su agrupación junto a otras cepas de *S. parauberis* en un grupo diferente con respecto a las cepas pertenecientes a la especie *S. uberis*. El análisis proteómico mediante MALDI-TOF MS permitió la identificación de cinco picos de masas en el rango de 2200-6000 m/z que resultaron ser específicos de la especie *S. parauberis*, permitiendo su identificación rápida y directa con respecto a otros patógenos y bacterias alterantes presentes en productos de origen marino y otros alimentos. Este estudio representa, a nuestro entender, la primera publicación sobre el aislamiento de *S. parauberis* en pescado en general y en productos marinos envasados al vacío, en particular. Además, proporciona un método rápido basado en MALDI-TOF MS para la identificación rápida de *S. parauberis*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaging refrigerated seafood products

I.C. Fernández-No^a, K. Böhme^a, P. Calo-Mata^a, B. Cañas^c, J.M. Gallardo^b, J. Barros-Velázquez^{a,*}^a Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain^b Department of Food Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), Higher Council for Scientific Research, C/Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain^c Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2010

Received in revised form

18 August 2011

Accepted 11 October 2011

Available online xxx

Keywords:

*S. parauberis**S. uberis*

Seafood

Vacuum-packaging

Food safety

Microbial identification

MALDI-TOF MS

Proteomics

ABSTRACT

Streptococcus parauberis is known as an etiological agent of mastitis in cows and for producing streptococcosis in farmed fish, although its presence in foods has seldom been reported. In this work, two bacterial isolates were recovered from a spoiled vacuum-packaged refrigerated seafood product. Both isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing, exhibiting 99% homology with respect to *S. parauberis*. Both isolates were also characterized by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Genetic analysis revealed the clonal homogeneity of the isolates and their grouping together with other *S. parauberis* strains in a different cluster with respect to *Streptococcus uberis* strains. Proteomic analysis by MALDI-TOF MS allowed for the identification of five mass peaks in the range of 2200–6000 *m/z* that resulted to be specific to the species *S. parauberis* and allowed its rapid and direct identification with respect to other pathogenic and spoilage bacteria potentially present in seafood and other food products. This study represents, to our knowledge, the first report of *S. parauberis* in seafood in general and in vacuum-packed food products in particular. Moreover, it provides a rapid method based on MALDI-TOF MS for the identification of *S. parauberis*.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Streptococcus parauberis, formerly *Streptococcus uberis* type II (Williams and Collins, 1990), is mainly known for causing mastitis in cows, an inflammatory disease that affects bovine mammary glands, which is isolated in up to 20% of cases (Bentley et al., 1993; McDonald et al., 2005). Bovine mastitis is the most significant source of loss for the dairy industry, due to lower milk yields, reduced milk quality, and higher production costs (Riffon et al., 2001). This species has also been reported to produce streptococcosis, an infectious disease in fish caused by gram-positive cocci in certain farmed fish species, such as olive flounder (Nho et al., 2009) and turbot (Domenech et al., 1996), with fish mortality rates over 70%.

Although *S. parauberis* is not a human pathogen, its presence in food has recently been associated with spoilage and quality deterioration in meat products, mainly because of its ability to ferment carbohydrates and grow at 10 °C or even 4 °C, despite its mesophilic

nature (Koort et al., 2006). Thus, although *S. parauberis* has traditionally not been isolated from food products, strains belonging to this species have recently been reported in broiler meat products subjected to modified atmosphere packaging (MAP) and in the air of broiler processing industrial plants (Koort et al., 2006). *S. parauberis* has also recently been isolated together with other lactic acid bacteria from Tunisian seafood and meat products (Najjari et al., 2008) and, more recently, from an artisan-type cooked ham subjected to MAP (Vasilopoulos et al., 2010). Thus, although *S. parauberis* belongs to the streptococci group, which is mostly associated with animal diseases, recent studies have reported its presence in foods and its ability to survive and grow on MAP meat (Koort et al., 2006; Vasilopoulos et al., 2010).

In the seafood industry, vacuum-packaging (VP) and MAP are often combined with refrigeration and other nonthermal processing techniques to commercialize minimally-processed products that provide consumers with products possessing better nutritional and organoleptic properties (Phillips, 1996). Moreover, VP is also often combined with pre-cooking treatments to increase the number of ready-to-eat seafood products. However, in these applications, microbial spoilage of food is not totally prevented. Thus, in our study, two isolates of *S. parauberis* were recovered, to

* Corresponding author. Tel.: +34 600942264; fax: +34 981 825474.
E-mail address: jorge.barros@usc.es (J. Barros-Velázquez).

Table 1

Biochemical characterization of bacterial isolates by API 20 STREP. VP (Voges–Proskauer), HIP (hippuric acid), ESC (esculin), PYRA (pyrrolidonyl arylamidase), α -GAL (α -galactosidase), β -GUR (β -glucuronidase), β -GAL (β -galactosidase), PAL (alkaline phosphatase), LAP (leucine aminopeptidase), ADH (arginine dihydrolase), RIB (ribose), ARA (arabinose), MAN (mannitol), SOR (sorbitol), LAC (lactose), TRE (trehalose), INU (inulin), RAF (raffinose), AMD (starch) and GLYG (glycogen).

VP	HIP	ESC	PYRA	α -GAL	β -GUR	β -GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
+	+	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–

the best of our knowledge, for the first time from a spoiled VP seafood product consisting of minced fish and other ingredients. Accordingly, the first goal of this work was to characterize these *S. parauberis* using phenotyping and genotyping tools and comparing them with other reference *S. parauberis* strains and to other microbial strains isolated from food products and other sources. The second goal was to apply, for the first time, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for the direct identification of *S. parauberis* and to differentiate it from other pathogenic and specific spoilage microorganisms of relevance in seafood products.

2. Materials and methods

2.1. Microbial isolation and phenotypic characterization

Two bacterial isolates were recovered from Plate Count Agar (Oxoid Ltd., London, UK) from a spoiled minimally-processed seafood product subjected to VP and refrigerated storage, as provided by a local seafood industry. The composition of the commercial surimi-based product was minced fish and the following ingredients: egg white, water, salt, wheat starch, sunflower oil and flavor promoters.

The proteolytic phenotype of the isolates was investigated in casein-agar medium (30 °C/48 h) (Phaff et al., 1994), as previously described (Ben-Gigirey et al., 2000). The lipolytic phenotype was investigated in tributyrin-agar medium as described elsewhere (Ben-Gigirey et al., 2000). The investigation of histamine production was carried out at 37 °C in Niven medium (Niven et al., 1981). The investigation of H₂S production was carried out in triple sugar iron (TSI) agar (Oxoid). This test also allowed for the detection of the fermentation of lactose, sucrose and glucose, with subsequent formation of acid and gas. In addition, colonies from each isolate were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) (3 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄ and 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) for catalase, oxidase and motility tests.

Complementary phenotypic characterization was performed using a miniaturized biochemical test API 20 STREP kit (Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, France) with a view to compare the assimilation of carbon sources and enzyme production profiles of both isolates (Table 1). The results of the identification tests were interpreted using the APILAB PLUS software (BioMérieux).

2.2. Genetic identification by nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene

The strains were inoculated in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid) and were incubated at 37 °C for 24 h. Then, the DNA was extracted using a commercial DNeasy Tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), as previously described (Hosseini et al., 2009), based on the use of microcolumns. The DNA concentration in the purified extracts was determined by fluorometry by means of the QUBIT™ method (Invitrogen, Paisley, UK).

Bacterial amplification of the 16S rRNA gene was performed with the highly conserved 16S rDNA primer pair, p8FPL (5'-AGTTT-GATCTGGCTCAG-3') and p806R (5'-GGACTACCAGGTATCTAAT-3')

(Angert et al., 1993; Relman et al., 1992). All amplification assays comprised 100 ng of template DNA, 25 μ L of a master mix (BioMix, Bioline, London, UK)—this included the reaction buffer, dNTPs, magnesium chloride, and Taq DNA polymerase—double-distilled water and 25 pmol of each oligonucleotide primer to achieve a final volume of 50 μ L. The amplification conditions were as follows: a preliminary denaturation step at 94 °C for 7 min, followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 60 s), annealing (55 °C for 60 s), extension (72 °C for 60 s) and final extension at 72 °C for 15 min. All PCR assays were carried out on a MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The PCR products were visualized by Sybr Safe (Invitrogen, Paisley, UK) staining of 2.5% horizontal agarose electrophoresis gels run at 100 V.

Prior to sequencing, the PCR products were purified using an ExoSAP-IT kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The same primers used for PCR were respectively employed for the sequencing of both strands of the PCR products. The sequencing reactions were analyzed in an automatic sequencing system (ABI 3730XL DNA Analyser, Applied Biosystems) provided with a POP-7 system. Single-nucleotide polymorphism (SNP) events in the DNA sequences were carefully reviewed by eye, using the Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia). Sequence alignment was accomplished using the CLUSTALW software (Thompson et al., 1994). Sequence homologies were found using the BLAST tool (National Centre for Biotechnology Information). Nucleotide sequences were compared and aligned among themselves and with respect to other sequences present in databases using the CLUSTALW software (Thompson et al., 1994); analyses were conducted using the MEGA software (Kumar et al., 2008) and the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) with 1000 bootstrap replicates to construct distance-based trees. The list of streptococcal strains considered in the phylogenetic study is shown in Table 2.

Table 2

Reference streptococcal strains from GenBank whose 16S rRNA nucleotide sequences were considered in the phylogenetic study.

Accession number	Microorganism
FJ009631	<i>Streptococcus parauberis</i> strain J151
AY942571	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 358
AY942570	<i>Streptococcus parauberis</i> strain 349
AF284579	<i>Streptococcus parauberis</i> strain SAP 99
EF204346	<i>Streptococcus parauberis</i> strain H19
EF204345	<i>Streptococcus parauberis</i> strain H18
EF204344	<i>Streptococcus parauberis</i> strain H17
AM946015	<i>Streptococcus uberis</i> strain 0140J
GU108497	<i>Streptococcus uberis</i> strain SC 13
AB023576	<i>Streptococcus uberis</i> strain HN1
NR_025148	<i>Streptococcus iniae</i> strain ATCC 29178
FJ951434	<i>Streptococcus iniae</i> strain DGX070902
AJ413205	<i>Streptococcus canis</i> strain CG40
EU075056	<i>Streptococcus canis</i> strain 1-82MP
AB002513	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> strain V36

The 16S rRNA nucleotide sequences from *S. parauberis* DSM6631, *S. parauberis* DSM6632 and *S. uberis* ATCC 19436, investigated in this study, were also included.

2.3. Identification by MALDI-TOF MS analysis

For MALDI-TOF MS analysis, small soluble proteins were extracted from intact bacterial cells using a fast method (Böhme et al., 2010a). Bacterial strains were grown on PCA (Oxoid) and were incubated for 24 h at 37 °C. One loopful (1-μl loop) of each bacterial culture was harvested in 100 μl of a solution of 50% acetonitrile (ACN) (Merck, Darmstadt, Germany) and 1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) (Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA) and was mixed by vortexing. After centrifugation at 8000 rpm for 10 min, the supernatant was transferred to a new tube and was stored frozen at –20 °C until analysis. A 1-μl aliquot of each sample solution was mixed with a 10-μl matrix solution that comprised 10 mg α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α -CHCA) in 1 ml 50% ACN and 2.5% aqueous TFA. From this final solution of sample and matrix, a 1-μl aliquot was manually deposited onto a stainless steel plate and allowed to dry at room temperature. Mass spectra were obtained using a Voyager DE STR MALDI-TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems) operating in linear mode, extracting positive ions with an accelerating voltage of 25,000 V and delay time of 350 ns. The grid voltage and guide wire were set to 95% and 0.05%, respectively. Each spectrum was the accumulated sum of at least 1000 laser shots, obtained from ten different regions and manually selected from the same sample spot in a range of 1500–15,000 Da.

For every strain, two extractions were carried out, and both extracts were measured in duplicate, thus giving four spectra for each bacterial strain. The spectra were calibrated using an external protein calibration mixture (insulin chain B oxidized and bovine insulin) (Sigma, Barcelona, Spain) and were analyzed with the DataExplorer® Software (Version 4.0.0.0). Mass spectra were baseline-corrected, noise-filtered and data lists containing m/z values were extracted from the mass spectra, including signals with relative intensities above 2%. The obtained peak mass lists were analyzed and compared using peaks in the mass range of 2000–10,000 Da, due to the good reproducibility of the spectral profile in that mass range. Mass lists were further processed with the free web-based application SPECLUST, available at <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> (Alm et al., 2006). The web application calculates the differences between peak lists and determines common peak masses. The tool was used to examine the four spectra of each sample, extracting representative peaks present in all four spectra and taking into account a peak match score larger than 0.7, corresponding to a measurement error of ± 5 Da. Furthermore, the obtained spectra and peak mass lists of the two strains were compared with a reference library that was created in our laboratory from previous studies (Böhme et al., 2010b; Fernández-No et al., 2010). The library included mass spectral data of the main pathogenic and spoilage bacterial species potentially present in seafood. The list of microbial species and strains considered in the MALDI-TOF study is shown in Table 3.

3. Results

3.1. Phenotypic characterization of microbial isolates

The spoiled seafood product considered in this work exhibited a darker color as compared with non-spoiled counterparts. In addition, the spoiled product exhibited an undesirable smell and texture when the package was opened. Two microbial isolates were obtained from the spoiled product. Both isolates were Gram-positive, catalase-negative, oxidase-negative and exhibited negative proteolytic and lipolytic phenotypes in agar-casein and agar tributyrin media, respectively. None of the bacterial isolates produced histamine or H₂S in Niven medium and triple sugar iron

Table 3

Reference microbial strains considered in the MALDI-TOF peptide mass fingerprinting study.

Microorganism
<i>Streptococcus parauberis</i> strain DSM6631
<i>Streptococcus parauberis</i> strain DSM6632
<i>Streptococcus uberis</i> strain ATCC 19436
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain Proc4T4
<i>Clostridium perfringens</i> strain ATCC 10543
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ATCC 13637
<i>Carnobacterium divergens</i> strain ATCC 35677
<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 25848
<i>Staphylococcus aureus</i> strain Proc1010
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain ATCC 17802
<i>Pseudomonas fragi</i> strain ATCC 4973

(TSI) agar, respectively. Both isolates fermented lactose, sucrose and glucose but did not produce gas out of them.

Biochemical and enzymatic profiles were investigated in both isolates by means of the API 20 STREP (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France); both strains exhibited the same phenotypic profile, as shown in Table 1.

3.2. Genetic identification of microbial isolates

The 16S rRNA nucleotide sequences proved to be identical for both strains. When this sequence was compared with other reference strains present in GenBank, the BLAST tool indicated a similarity of 99% with respect to *S. parauberis*. Thus, a phylogenetic tree was constructed with our isolates, other *S. parauberis* and other related *Streptococcus* spp. from GenBank (Fig. 1). Phylogenetic analysis indicated that our isolates 83B and 83C were grouped into the same cluster together with the rest of the *S. parauberis* strains, these including reference strains *S. parauberis* DSM6631 and *S. parauberis* DSM6632, initially considered by Williams and Collins (1990) in their proposal of *S. parauberis* as a novel species. On contrast, *S. uberis* strains were grouped in a different cluster. However, both species were grouped in a common branch due to the great similarity between the sequences of isolates belonging to *S. parauberis* and *S. uberis*, allowing their differentiation with respect to other streptococcal strains (Fig. 1).

3.3. MALDI-TOF MS fingerprinting

For each of the two isolates, four spectra were obtained by MALDI-TOF MS. Peak mass lists were extracted, and the four lists of each isolate were compared using the web application SPECLUST by searching common peak masses present in all four spectra. Arithmetic means were calculated for m/z values, and standard deviations were less than 3 Da. According to these specifications, the specific mass lists, which included 30 peak masses, were generated for each bacterial isolate, representing reproducible bacterial fingerprints. The spectral profiles were very similar (Fig. 2), and identical peak mass lists were obtained for both isolates (Table 4). Remarkably, reference strains *S. parauberis* DSM6631 and *S. parauberis* DSM6632 exhibited similar profiles as compared with isolates 83B and 83C (Fig. 2), these being easily distinguished from other bacterial species potentially present in seafood products (Fig. 3).

For species classification, the spectral profiles and peak mass lists were compared with the reference library of our laboratory, which included spectral data of more than 90 bacterial species relevant to seafood safety and quality. The four *S. parauberis* isolates possessed specific spectral profiles that could be easily differentiated from those of other bacterial species. When comparing the

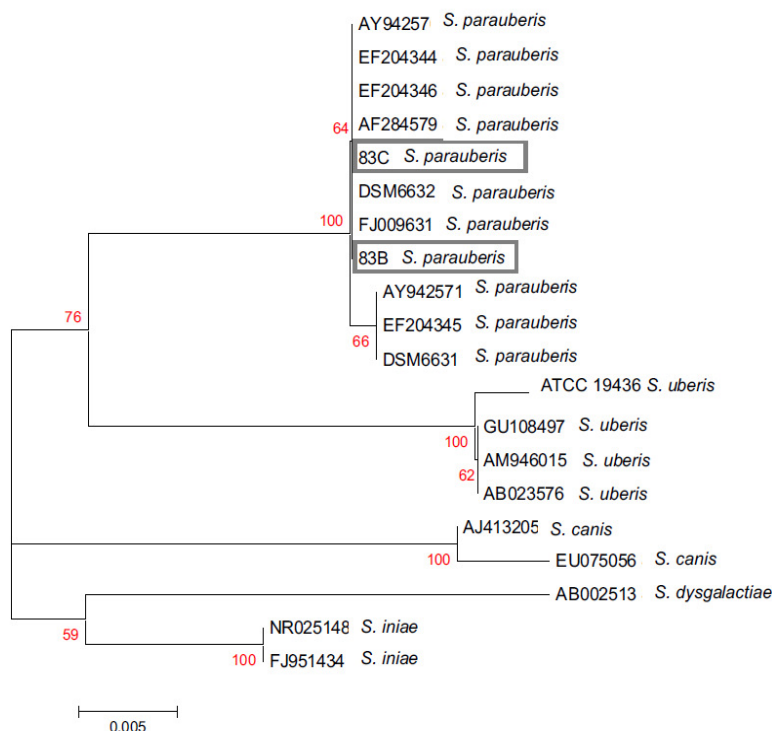


Fig. 1. 16S rRNA gene-based phylogenetic analysis of *S. parauberis* isolates from seafood product and other reference strains belonging to *S. parauberis*, *S. uberis* and *Streptococcus* spp. using the neighbor-joining method. Numbers above and below branches indicate bootstrap values from neighbor-joining analysis.

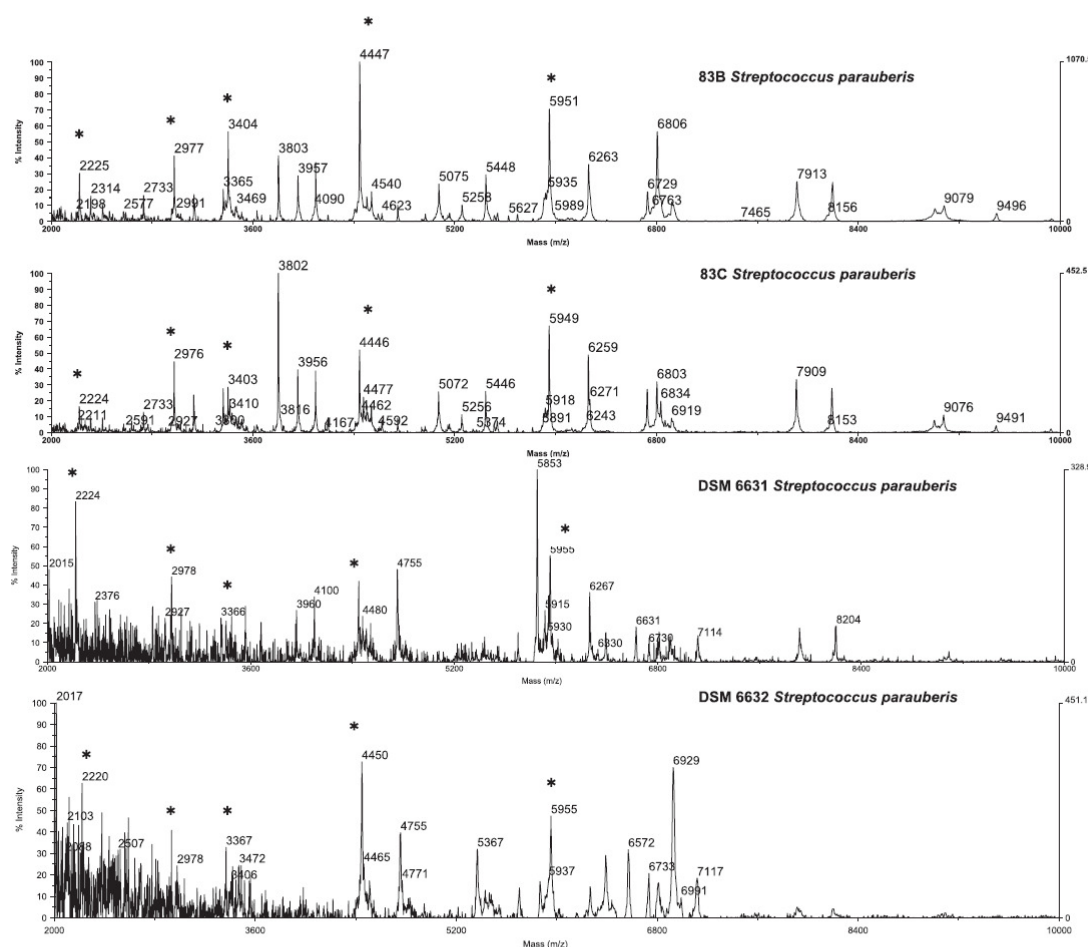
peak mass lists, five peaks m/z 2225, m/z 2977 \pm 1, 3406 \pm 3, 4448 \pm 2 and 5953 \pm 3 resulted to be specific of *S. parauberis*, not being found in any other bacterial species considered in this study (Table 4). Some peak masses could be found in common with other bacterial species, such as *Bacillus megaterium* (m/z 3130 \pm 2), *Clostridium perfringens* (m/z 6933 \pm 1), *Carnobacterium maltaromaticum* (m/z 4098 \pm 1) and *Staphylococcus aureus* (m/z 2976 \pm 1) (Table 4). Remarkably, few peaks were found in common with Gram-negative strains. However, no phyloproteomic relationship could be made to any genus or group of reference species considered, as the four *S. parauberis* isolates formed a separate group with few peak masses in common with other bacterial species.

4. Discussion

Today, the food processing industry is undergoing great efforts to achieve the microbiological safety of food products and, at the same time, extend their shelf life. In this sense, the combination of VP and refrigeration storage is widely used in the food industry because of its effectiveness in reducing oxidative reactions and inhibiting microbial growth (Flick et al., 1992). However, this is not sufficient to completely avoid the growth of pathogenic or spoilage bacteria. Other authors have previously reported the isolation of spoilage strains belonging to the genera *Lactobacillus* and *Photobacterium* from chilled vacuum-packed cold-smoked salmon (Olofsson et al., 2007). Likewise, specific spoilage strains of *Pseudomonas* and *Shewanella* have been isolated from other chilled fish and seafood products (Pantazi et al., 2008). Although refrigerated storage under 5 °C improves the stability and safety of vacuum-packed seafood products by reducing the growth of mesophiles

(Chen, 1995), a wide variety of microorganisms, even pathogenic strains, have been isolated from refrigerated seafood products due to their ability to grow at refrigeration temperatures. Among these, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* have been reported (Hudson and Mott, 1993).

For the reasons stated above, the quick identification of the microorganisms potentially involved in the loss of quality and safety of seafood products is of crucial importance. In our study, due to spoilage caused by *S. parauberis* and its recently reported presence in other packaged products, the characterization and fast identification of this bacterial species is essential. Although this species has not been traditionally linked to food spoilage, three isolates belonging to this species have been recently reported to spoil broiler meat subjected to MAP, also being isolated from the air of a broiler meat processing plant (Koort et al., 2006). Another recent study also reported the isolation of a *S. parauberis* strain from artisan-type cooked ham stored for 2 days in a high-care area at 2 °C after pasteurization and before packaging, though this strain could not be isolated in the final packaged food product (Vasilopoulos et al., 2010). These previous works have described that this species is able to grow at low temperatures even under MAP conditions using carbohydrates such as starch as carbon source. The fact that the surimi-based product considered in our study included wheat starch as ingredient may explain that *S. parauberis* was able to grow and spoil this processed product. In this sense, our study agrees with the results of these previous reports and provides additional evidence of the potential presence and growth of *S. parauberis* in other food products containing complex carbohydrates, such as seafood-based products, including those preserved by VP.



2. Mass spectrometry profiles of *S. parvauberis* isolates 83B and 83C, *S. parvauberis* DSM6631 and *S. parvauberis* DSM6632. Specific peaks of *S. parvauberis* are highlighted with asterisks (*).

The three *S. parvauberis* isolates from broiler meat reported by our authors exhibited high similarity among themselves and with respect to *S. parvauberis* strains, according to 16S rRNA gene sequencing (Koort et al., 2006). A similar result was obtained in our study, where phenotypic, genotypic and proteomic analysis revealed that both *S. parvauberis* isolates recovered from spoiled vacuum-packed seafood were identical, suggesting their clonal homogeneity. *S. parvauberis* has been reported to be easily distinguished from *S. uberis* by 16S ribosomal RNA sequencing (Williams Collins, 1990). Phylogenetic analysis of our *S. parvauberis* isolates and 83C with respect to other *S. parvauberis* strains was also performed, the results of which were in good agreement with previous study (Koort et al., 2006).

Finally, our study also provides the first report of the application of a robust molecular tool such as MALDI-TOF MS analysis to obtain a mass spectrometric characteristic profile of *S. parvauberis* isolates for rapid identification purposes. MALDI-TOF MS fingerprinting has proved to be a fast and cost-effective technique for bacterial species identification (Giebel et al., 2010; Lay, 2001). Thus, the comparison of spectral profiles of unknown bacterial strains to a spectral reference library allows the classification and identification of these

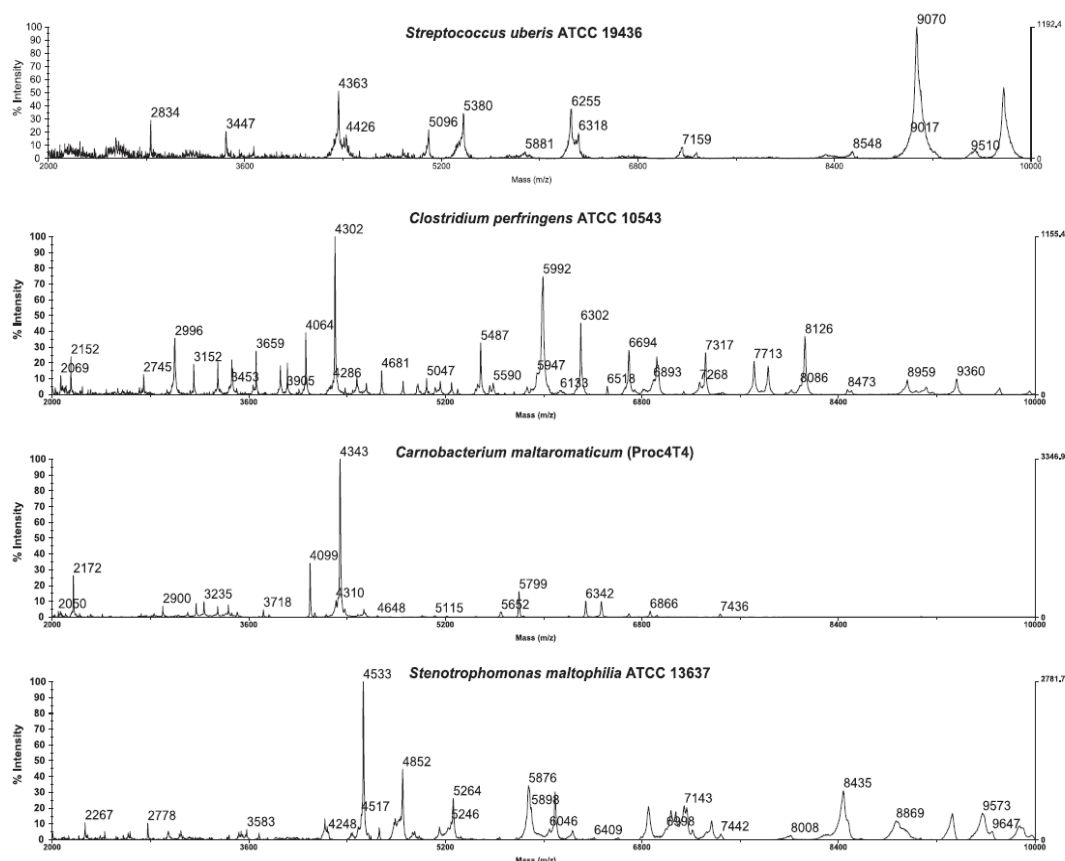
strains in a rapid and accurate way (Böhme et al., 2010; Seng et al., 2009). The mass spectrometric profiles obtained for *S. parvauberis* isolates 83B and 83C were identical, representing a specific spectral profile and peak mass list that can be easily differentiated from all other bacterial species present in the reference library. Furthermore, when compared to reference strains *S. parvauberis* DSM6631 and *S. parvauberis* DSM6632, five peak masses were determined as being specific for this species and could serve as biomarker peaks for *S. parvauberis* in future analysis.

In summary, this study provides the first report of the isolation of *S. parvauberis* from seafood in general and from refrigerated products subjected to VP in particular, underlining the notion that this species should probably be considered in the investigation of specific spoilage organisms in this kind of food product. Genetic analysis revealed the grouping of *S. parvauberis* isolates 83B and 83C with other reference strains from this species in a different cluster with respect to *S. uberis*. Finally, the application of MALDI-TOF MS allowed for the rapid and direct identification of *S. parvauberis*, providing specific spectral fingerprints that could be used to easily distinguish this strain from other pathogenic and spoilage bacteria of relevance to seafood and other food products.

Table 4

Peak mass lists of *S. parauberis* isolates 83B/83C, *S. parauberis* DSM6631 and DSM6632 and other bacterial species of relevance in seafood products.

Bacterial species	Peak mass list
<i>Streptococcus parauberis</i> 83B/83C	2225 , 2314, 2409, 2733, 2976 , 3132, 3365, 3404 , 3802, 3957, 4098, 4447 , 4503, 4540, 4749, 4967, 5074, 5257, 5447, 5950 , 6261, 6728, 6805, 6922, 6933, 7911, 8153, 9005, 9078, 9494
<i>Streptococcus parauberis</i> DSM6631	2225 , 2927, 2978 , 3366, 3408 , 3558, 4100, 4450 , 4467, 4510, 4750, 4818, 5833, 5854, 5874, 5943, 5956 , 6267, 6392, 6633, 6735, 6813, 7114, 7915, 8204
<i>Streptococcus parauberis</i> DSM6632	2015, 2036, 2067, 2089, 2133, 2207, 2225 , 2478, 2517, 2561, 2978 , 3409 , 3464, 4450 , 4464, 4511, 4754, 5368, 5865, 5954 , 5973, 6391, 6571, 6813, 6928, 7114
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 19436	2834, 3447, 4364, 4426, 4887, 5096, 5380, 6255, 6317, 7157, 7275, 8547, 9070, 9542, 9778
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> Proc4T4	2172, 2900, 3172, 3236, 3347, 3434, 3719, 4099, 4343, 5799, 6342, 6470
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 10543	2152, 2745, 2998, 3152, 3348, 3462, 3468, 3660, 3858, 3915, 4065, 4302, 4682, 5488, 5992, 6303, 6695, 6932, 7318, 7714, 7828, 8127, 8959, 9362
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	2267, 2778, 3048, 4219, 4238, 4533, 4663, 4782, 4792, 4852, 5154, 5264, 5881, 6093, 6236, 6854, 7036, 7075, 7143, 7164, 7212, 7367, 8009, 8439, 9322, 9573
<i>Carnobacterium divergens</i> ATCC 35677	2171, 2717, 2859, 3228, 3347, 3419, 3762, 4342, 4836, 5718, 6456, 6693
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 25848	2002, 2059, 3129, 3551, 4302, 4604, 4612, 4790, 4975, 5201, 5826, 6254, 6737, 7445
<i>Staphylococcus aureus</i> Proc1010	2278, 2287, 2307, 2606, 2635, 2672, 2977, 3006, 3442, 4302, 5028, 5520, 6882
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	2139, 2399, 2590, 3044, 3083, 3179, 3203, 3226, 3598, 3755, 4176, 4276, 4536, 4701, 4730, 5146, 5178, 6164, 6357, 6402, 6449, 7193, 7507, 8086, 8351, 9067, 9459, 9927
<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973	2217, 2533, 3022, 3304, 3592, 3617, 3800, 4126, 4431, 4463, 5064, 5656, 6041, 6375, 6607, 7181, 7231, 7598, 8253, 8337, 8926, 9124, 9554, 9890

Peak masses are presented as $[M + H]^+$ values. Specific peak masses of *S. parauberis* are highlighted in bold.Fig. 3. Mass spectrometry profiles of *S. uberis* ATCC 19436, *Clostridium perfringens* ATCC 10543, *Carnobacterium maltaromaticum* Proc4T4 and *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637. The peak mass lists of these and other bacterial species potentially present in seafood products are given in Table 4.

Acknowledgments

This work was funded by project 10PXIB261045PR from Xunta de Galicia and by project AGL2010-19646 from the Spanish Ministry of Science and Technology. I.C. Fernández-No and K. Bohme are recipients of "Lucas Labrada" and "Maria Barbeito" research contracts from Xunta de Galicia, respectively.

References

- Alm, R., Johansson, P., Hjerno, K., Emanuelsson, C., Ringner, M., Hakkinen, J., 2006. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of Proteome Research* 5, 785–792.
- Angert, E., Clements, K., Pace, N., 1993. The largest bacterium. *Nature* 362, 239–241.
- Ben-Gigirey, B., de Sousa, J., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology* 57, 19–31.
- Bentley, R., Leigh, J., Collins, M., 1993. Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 57–60.
- Böhme, K., Fernández-No, I.C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J.M., Cañas, B., Calo-Mata, P., 2010a. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Methods* 2, 1941–1947.
- Böhme, K., Fernández-No, I., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J., Calo-Mata, P., Canas, B., 2010b. Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Journal of Proteome Research* 9, 3169–3183.
- Böhme, K., Fernández-No, I.C., Gallardo, J.M., Cañas, B., Calo-Mata, P., 2010c. Safety assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food and Bioprocess Technology* 6, 907–918.
- Chen, H., 1995. Seafood microorganisms and seafood safety. *Journal of Food and Drugs Analysis* 3 (3), 133–144.
- Domenech, A., Fernandez Garayzabal, J., Pascual, C., Garcia, J., Cutuli, M., Moreno, M., 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases* 19, 33–38.
- Fernandez-No, I., Bohme, K., Gallardo, J., Barros-Velazquez, J., Canas, B., Calo-Mata, P., 2010. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 31, 1116–1127.
- Flick, G., Hong, G., Knobl, G., 1992. Lipid oxidation of seafood during storage. *Lipid Oxidation in Food* 500, 183–207.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S., Kleinheinz, G., Robbins, M., Sandrin, T., 2010. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges. *Advances in Applied Microbiology* 71, 149–184.
- Hosseini, S., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J., 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1392–1403.
- Hudson, J., Mott, S., 1993. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology* 10, 61–68.
- Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Bjorkroth, J., 2006. *Streptococcus parauberis* associated with modified atmosphere packaged broiler meat products and air samples from a poultry meat processing plant. *International Journal of Food Microbiology* 106, 318–323.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299–306.
- Lay, J., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 172–194.
- McDonald, W.L., Fry, B.N., Deighton, M.A., 2005. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Veterinary Microbiology* 111, 241–246.
- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., Zagorec, M., 2008. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology* 121, 342–351.
- Nho, S., Shin, G., Park, S., Jang, H., Cha, I., Ha, M., 2009. Phenotypic characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *FEMS Microbiology Letters* 293, 20–27.
- Niven, C., Jeffrey, M., Corlett, D., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 321–322.
- Olofsson, T., Ahne, S., Molin, G., 2007. The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7 °C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *Journal of Applied Microbiology* 103, 109–119.
- Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontomina, M., Savva, I., 2008. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology* 25, 136–143.
- Phaff, H., Starmer, W., Lachance, M., Ganter, P., 1994. *Candida caseinolytica* sp.-nov., a new species of yeast occurring in necrotic tissue of opuntia and stenocereus species in the Southwestern United States and Baja-California, Mexico. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 641–645.
- Phillips, C., 1996. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science Technology* 31, 463–479.
- Relman, D., Schmidt, T., MacDermott, R., Falkow, S., 1992. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *New England Journal of Medicine* 327, 293–301.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagace, J., 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2584–2589.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Seng, P., Drancourt, M., Couriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543–551.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology* 27, 77–84.
- Williams, A., Collins, M., 1990. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* type I and type II description of *Streptococcus parauberis* sp.-nov. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 485–490.

3.4. CAPÍTULO 4

Detección y cuantificación de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* patógenos y alterantes de alimentos mediante PCR en tiempo real

Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR

I.C. Fernández-No, M. Guarddon, K. Böhme, A. Cepeda, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez

Publicado en *Food Microbiology* Volume 28, nº 3, páginas de la 605 a la 610, mayo 2011

RESUMEN

Bacillus cereus, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* son especies bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, esporoformadoras y por lo tanto resistentes a tratamientos térmicos. De ahí que estas bacterias puedan estar presentes en alimentos tanto frescos como pasteurizados. En este trabajo se ha desarrollado una metodología basada en la técnica PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación de dichas especies. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos y una sonda tipo TaqMan. En el presente estudio se consideraron 48 cepas bacterianas pertenecientes a estas especies, extrayéndose el ADN y amplificándose un fragmento del gen 16S ADNr. Los amplicones se secuenciaron y las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de referencia del GenBank, seleccionándose secuencias consenso para las tres especies seleccionadas. Asimismo, con el fin de establecer el método de cuantificación se construyeron 2 curvas de RTi-PCR, una a partir de ADN extraído de cultivos de *B. cereus* diluidos en serie, así como una segunda curva con ADN extraído de un producto alimentario esterilizado e inoculado posteriormente con diluciones seriadas de *B. cereus*. Las curvas exhibieron valores de R^2 de 0.9969 y 0.9958, respectivamente. La correlación linear entre \log_{10} de la concentración de ADN y el valor del ciclo umbral de amplificación (Ct) se mantuvo en un rango de 1.65×10^1 CFU/mL hasta 1.65×10^6 CFU/mL para ambas curvas estándar. La especificidad de los oligonucleótidos y de la sonda fue testada con ADN extraído de cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*, con los cuales se obtuvieron valores de Ct entre 14 y 15, mientras que se detectaron amplificaciones inespecíficos de ADN extraído de otras especies bacterianas de interés alimentario a valores de Ct por encima de 28.5. A nuestro entender, este método representa el primer estudio de determinación simultánea de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* patógenas o alterantes en productos

alimentarios, con el fin de prevenir y detectar precozmente su presencia en la cadena alimentaria.



Short Communication

Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR

I.C. Fernández-No, M. Guarddon, K. Böhme, A. Cepeda, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-27002 Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2010

Received in revised form

29 September 2010

Accepted 19 October 2010

Available online 27 October 2010

Keywords:

Real-time PCR

Quantitative PCR

Microbial detection

Bacillus

ABSTRACT

A new primer-probe set for the detection and quantification of *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* by real-time PCR (Rti-PCR) was developed. For it, forty-eight strains belonging to these species were considered. The DNA of these strains was isolated and a fragment of the 16S rRNA gene amplified. The amplicons were sequenced and the obtained sequences were aligned with reference sequences from the GenBank. For the development of the Real-Time PCR (RTi-PCR) methodology based on TaqMan probes, a primer pair and probe, specific for the studied *Bacillus* spp., were designed. To establish the quantification method, two RTi-PCR standard curves were constructed; one with DNA extracted from a serially-diluted *B. cereus* culture and a second curve with DNA extracted from a sterilised food product inoculated with serial dilutions of *B. cereus*. The curves exhibited R^2 values of 0.9969 and 0.9958 respectively. Linear correlations between the \log_{10} input DNA concentration and the threshold cycle (Ct) values were observed with a magnitude of linearity in the range of 1.65×10^1 CFU/mL to 1.65×10^6 CFU/mL for both standard curves. The specificity of the designed primers and probe was tested with DNA extracted from *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* strains, which gave Ct values between 14 and 15, whereas non-specific amplifications of the DNA from other microbial species of food interest exhibited a Ct value above 28.5. To our knowledge, this method represents the first study about the quantification of spoilage and/or pathogenic *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* in food products, with the aim to prevent the presence of these undesirable species in the food chain.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus species are ubiquitous and diverse both in the terrestrial and marine ecosystems (Oguntoyinbo, 2007) and they can be introduced in food during processing. The genus *Bacillus* includes species like *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* or *Bacillus subtilis* that may be present in fresh and pasteurised food products due to their ability to generate heat-resistant spores under adverse environmental conditions.

Among bacilli, *B. cereus* has been recognised as a causative agent of food poisoning for more than 40 years with this species linked to foodborne emetic and diarrhoeal syndromes (Ghelardi et al., 2002). *B. licheniformis* has also been associated with a variety of clinical syndromes, such as enteric disease, septicaemia, peritonitis, ophthalmitis and food poisoning events in humans in addition to bovine toxemia and abortions (Salkinoja-Salonen et al., 1999). *B. licheniformis* has also been described to be responsible for food spoilage

events, such as roty bread (Sorokulova et al., 2003). Although *B. subtilis* has not traditionally considered to be a human pathogen, some strains of this species may occasionally cause food poisoning, such as the 2005 outbreak in a kindergarten caused by milk powder (Pavic et al., 2005).

Bacterial identification methods based on biochemical tests, such as the miniaturised API system or conventional culture method, have been traditionally used for the detection and identification of *Bacillus* spp. in food samples (Encinas et al., 1996). More recently, newer molecular methods based on DNA hybridisation and polymerase chain reaction (PCR) have been proposed for the rapid and sensitive detection of *Bacillus* spp. Thus, primers targeted to the 16S rRNA gene have been used to identify *Bacillus* spp. by conventional PCR (Wattiau et al., 2001). This technique has also been combined with amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for identification purposes (Wu et al., 2006).

More recently, RTi-PCR has been introduced for the detection and quantification of major foodborne spoilage and/or pathogenic bacteria. As a consequence, a large number of RTi-PCR procedures are currently available for the specific detection and quantification

* Corresponding author. Tel.: +34 600942264; fax: +34 981 825474.
E-mail address: jorge.barros@usc.es (J. Barros-Velázquez).

of foodborne bacteria, such as *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* or *Leuconostoc mesenteroides* (Alarcon et al., 2006; Elizaquivel et al., 2008; Hein et al., 2001; Malorny et al., 2004; Nogva et al., 2000). In the case of *Bacillus* spp., a RTi-PCR protocol based on TaqMan probes targeted to the 16S rRNA gene has been designed for the detection and quantification of the *B. cereus* group (Martinez-Blanch et al., 2009; Reekmans et al., 2009). The isolates of these bacilli are frequently responsible for the spoilage of minimally processed and pasteurised food products that compromises their safety (Rosenkvist and Hansen, 1995).

Accordingly, the main goal of this study was to design a new primer-probe set targeted to 16S rRNA sequences for detecting the presence and determining the concentration of *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* by RTi-PCR.

2. Materials and methods

2.1. DNA amplification and sequencing of the 16S rRNA gene

Forty-eight bacterial isolates considered in this work belonged to the collection of *Bacillus* spp. of our laboratory. Such strains had been isolated from food products subjected to vacuum packaging, pasteurisation and refrigerated storage, thus being able to survive the pasteurisation process. Twenty-three of the strains were *B. licheniformis*, ten *B. cereus* and fifteen *B. subtilis*.

All isolates were cultured in plate count agar (PCA; Oxoid, Hampshire, England) at 30 °C for 24 h and the capability for producing spores was investigated by the Wirtz–Conklin spore staining method (Schaeffer and MacDonald, 1933). All 48 strains were inoculated in Brain–Heart–Infusion (BHI; Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) and incubated at 30 °C for 24 h. Bacterial DNA was then extracted by the commercial DNeasy tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) as previously described (Hosseini et al., 2009). DNA concentration in the purified extracts was determined using a QUBIT TM fluorometer (Invitrogen, Paisley, UK).

Bacterial amplification of the 16S rRNA gene was performed with the highly conserved 16S rDNA primer pair as follows: p8FPL (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and p806R (5'-GGACTACAGGTATCTAAT-3') (Angert et al., 1993; Relman et al., 1992). All amplification assays comprised 100 ng of template DNA, 25 µL of a master mix (BioMix, Bioline, London, UK) consisting of the reaction buffer, dNTPs, magnesium chloride and Taq DNA polymerase, 25 pmol of each oligonucleotide primer and double distilled water to achieve a final volume of 50 µL. Amplification conditions were as follows: denaturing step at 94 °C for 7 min followed by 35 cycles with denaturation (94 °C for 60 s), annealing (55 °C for 60 s) and extension (72 °C for 60 s) followed by a final extension at 72 °C for 15 min. All PCR assays were carried out on a MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The PCR products were visualised by ethidium bromide staining of 2.5% horizontal agarose electrophoresis gels run at 100 V.

Prior to sequencing, the PCR products were purified by using an ExoSAP-IT kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used for PCR were also employed for the sequencing of both strands of the PCR products. Sequencing reactions were analysed in an automatic sequencing system (ABI 3730XL DNA Analyser, Applied Biosystems) with a POP-7 system. SNP (Single Nucleotide Polymorphism) events in DNA sequences were carefully reviewed by eye using the Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia). Sequence homologies were evaluated using the BLAST tool (National Centre for Biotechnology Information). All sequences were carefully revised and sequence alignment was accomplished using the CLUSTALW software (Thompson et al., 1994).

2.2. Design and optimisation of the TaqMan RTi-PCR assay

The following strains were selected on the basis of nucleotide sequencing data as representatives of the total 48 *Bacillus* spp. isolates of industrial origin initially considered in this study: *B. licheniformis* strains B120, B122, B131, B133 and B141; *B. cereus* strains Bc21, Bc28, Bc43 and Bc44; and *B. subtilis* strains Bs14, Bs18, Bs32, Bs34 and Bs37. Other *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* reference strains also employed for the design of primers are listed in Table 1. In addition, relevant strains belonging to species other than *Bacillus* that may be isolated from vacuum-packaged food products were also considered in this study as negative controls (Table 1).

Different concentrations of each primer (300 nM, 400 nM and 900 nM), probe (100 nM and 200 nM) and MgCl₂ (1.5 mM, 3.0 mM and 5.0 mM) were assayed. 2X TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems) and 5.5 µL of sample were also added to a final volume of 25 µL. RTi-PCR assays were carried out in a ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) programmed at 95 °C for polymerase activation followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 60 °C for 1 min. Reactions were carried out in triplicate. PCR results were given as the increase in the fluorescence signal of the reporter dye detected and visualised by the 7000 System software v1.2.3f2 (Applied Biosystems). Threshold cycle (Ct) values represent the PCR cycle in which a first increase in fluorescence over a defined threshold occurred for each amplification plot.

2.3. Quantification and specificity assays

Two different standard curves were prepared for quantification purposes. The first curve was constructed using genomic DNA from *B. cereus* cultures in BHI broth (Oxoid) with different bacterial concentrations (10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ and 10⁶ CFU/mL) as determined by measuring the absorbance at 600 nm and comparing with the microbial counts in PCA (Oxoid). One millilitre from each bacterial concentration was subjected to DNA extraction by means of the DNeasy tissue kit (Qiagen).

The second standard curve was prepared by inoculating known concentrations of *B. cereus* in a commercial surimi-based pasteurised food product consisting of fish and other ingredients like egg whites, water, salt, wheat starch, sunflower oil and flavor promoters. Thus, such commercial food product was purchased in a local supermarket and sterilised at 121 °C for 15 min in an autoclave (AE 75 Sterilmatic, Raypa, Barcelona). Afterwards, a colony of the Bc21 *B. cereus* strain was inoculated in BHI broth (Oxoid) and incubated at 30 °C for 24 h until a bacterial concentration of 1.65 × 10⁸ CFU/mL was reached, which corresponded to a A₆₀₀ = 0.831. Portions of this culture were taken and used to inoculate sterile food with the following concentrations: 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ and 10⁶ CFU/mL. Samples (25 g) of the

Table 1
Bacillus spp. and other reference strains considered in this study and belonging to other relevant species that may also be isolated from food products are shown. The accession numbers of the sequences used are indicated.

Microorganism	Accession number
<i>Bacillus cereus</i> UST2006-BC004	FJ188299
<i>B. cereus</i> ST307	EU350369
<i>B. cereus</i> PEBC08010810	FJ685763
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	CP000002
<i>Bacillus subtilis</i>	FJ465167
<i>B. subtilis</i> GZUB2	FJ457114
<i>Clostridium botulinum</i> C-Stockholm	FN552458
<i>Lactobacillus</i> 30A	FJ971864
<i>Micrococcus</i> sp JAM-AC11	AB526326
<i>Streptococcus</i> sp MV1	GU045364

Table 2
Strains employed for the specificity assays.

Bacterial strain	Code	Origin ^a
<i>Bacillus cereus</i>	Bc53	Our collection ^b
<i>B. cereus</i>	BaC23	ATCC 14893 CECT 4014
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bl23	Our collection ^b
<i>B. licheniformis</i>	BaL51	ATCC 14580 CECT 20
<i>Bacillus subtilis</i>	Bs67	Our collection ^b
<i>B. subtilis</i>	Bs74	Our collection ^b
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	BaS05	ATCC 6633 CECT 356
<i>Citrobacter freundii</i>	Cif01	ATCC 8090 CECT 401 T
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Eba01	ATCC 13048 CECT 684 T
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	KlPh21	ATCC 10031 CECT 142
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	MoM02	ATCC 8076H CECT 173
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	PhP03	CECT 4172 CECT 4172
<i>Proteus vulgaris</i>	PrV21	ATCC 9484 CECT 165
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PsF12	ATCC 13525 CECT 378 T
<i>Pseudomonas fragi</i>	PsFr51	ATCC 4973 CECT 446 T
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	SrM53	ATCC 274 CECT 159
<i>Staphylococcus xylosum</i>	SyX11	ATCC 29971 CECT 237 T
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	StM03	ATCC 13637 CECT 115

CECT Spanish Type Culture Collection.

^a ATCC American Type Culture Collection.

^b Bacteria isolated from food products.

inoculated products were then homogenised in 225 mL of sterile 0.1% peptone water (Merck, Darmstadt, Germany). One millilitre of each homogenate was taken, and *B. cereus* DNA was extracted with a DNeasy tissue kit (Qiagen) as previously described.

All extractions and determinations, both for cultures and artificially contaminated food samples, were performed by triplicate. Average Ct values (from triplicates) and standard deviations (SD) were calculated for each dilution. The Ct value was plotted against the log concentration of the template DNA, and the slope of the obtained regression line was used for calculating the efficiency (E) with the following equation: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ (Klein, 2002). Table 2 compiles the list of *Bacillus* spp. used to evaluate the specificity of the RTi-PCR protocol and other microorganisms considered as negative controls to verify the specificity of the method.

3. Results

3.1. DNA amplification and sequencing of the 16S rRNA gene

The 16S rRNA sequences of the 48 *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* strains were aligned and fourteen of them were selected as representatives of the genomic diversity of all the initial strains.

FN55248 <i>Clostridium botulinum</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGGGAAACCTGACGAGCAACGC.....
GU045364 <i>Streptococcus</i> sp.CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGGGAAACCTGACGAGCAACGC.....
BI22 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
BI20 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
FJ188299 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
BI31 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
FJ465167 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
FJ685763 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
CP000002 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
FJ457114 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
EU350369 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bs14 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bs34 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bs18 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bc21 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bc44 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bc43 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
BI33 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
BI41 <i>Bacillus licheniformis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bc28 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bs37 <i>Bacillus cereus</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
Bs32 <i>Bacillus subtilis</i>CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGAGCAACGC.....
AB526326 <i>Micrococcus</i> sp.CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATCTTCGCAATGGGCGCAAGCTGATGACGAGCGCG.....
FJ971864 <i>Lactobacillus</i> 30ACCTGGCTCAGGATGAACGCTGGGCGCGTGGCTAATAATGCAAGTCGAGGCGATCGGCCC.....

Fig. 1. Sequence alignment of a 16S rRNA region in *Bacillus* spp. and other bacteria associated with pasteurised food products and used as negative controls. The sequences that were considered as primer targets are boxed in the image.

Table 3
Nucleotide sequences of primers and probes designed for the detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus* spp. by RTi-PCR.

	Length	Position ^a	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Annealing t ^a
BacillusfishF	20	342	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	59 °C
BacillusfishR	20	344	CGGTTCCTCCCTCAGACTTT	59 °C
BacillusfishS	16	382	^b FAM-AATCTTCCGCAATGGA-MGB ^c	69 °C

^a Nucleic acid sequence location based on the GenBank accession number FJ457114 (*Bacillus subtilis* GZUB2).

^b FAM (carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester).

^c MGB (Minor Groove Binder).

The sequences of these fourteen strains were then aligned with reference sequences of other *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* strains, as well as other non-*Bacillus* spp. that may be present in pasteurised vacuum-packaged food products (Table 1). On the basis of this alignment, a conserved region in the 16S rRNA gene of the selected *Bacillus* spp. sequences was observed (Fig. 1). A set of primers and an MGB TaqMan probe targeted to this conserved region were designed, allowing the amplification of a 78 bp fragment of the 16 rRNA gene (Table 3).

3.2. Standard curves, detection and quantification limits of TaqMan RTi-PCR

To optimise the reaction conditions, different amounts of reagents were tested, and major specificity was obtained when 400 nM of each primer, 200 nM of probe and 3 mM MgCl₂ were used. Primer specificity was tested by RTi-PCR using the optimised reaction conditions and 10 ng of purified DNA from each of the strains listed in Table 2.

Table 4 compiles the Ct values obtained from 10-fold dilutions of genomic DNA extracted in BHI broth and from genomic DNA extracted in the inoculated products. The corresponding correlation curves obtained are presented in Fig. 2. The linear correlation between log input CFU/mL and Ct values was observed with a linearity ranging from 1.21 log CFU/mL to 6.21 log CFU/mL (1.65×10^1 CFU/mL to 1.65×10^6 CFU/mL) for both curves, which is equivalent to a range of 1.65×10^2 CFU/g to 1.65×10^7 CFU/g in the undiluted original food. When BHI broth was employed as a matrix, the mathematical expression that related the log CFU/mL versus the Ct values obtained was as follows: $y = -3.249x + 32.682$, with a R^2 value of 0.9969. When inoculated food samples were used as matrices, the same linearity range was obtained. In this case, the

Table 4

C_T values corresponding to standard curves derived from the TaqMan RTi-PCR assay with 10-fold serial dilutions of *B. cereus* in BHI and in artificially contaminated food products.

Bacillus cereus in BHI		Bacillus cereus in homogenate sterile food product	
CFU/mL	C _T (Mean ± SD)	CFU/mL	C _T (Mean ± SD)
1.65 × 10 ⁶	13.24 ± 0.05	1.65 × 10 ⁶	14.30 ± 0.19
1.65 × 10 ⁵	16.61 ± 0.07	1.65 × 10 ⁵	16.84 ± 0.42
1.65 × 10 ⁴	19.30 ± 0.10	1.65 × 10 ⁴	20.34 ± 0.21
1.65 × 10 ³	23.10 ± 0.21	1.65 × 10 ³	24.01 ± 0.02
1.65 × 10 ²	26.23 ± 0.10	1.65 × 10 ²	26.60 ± 0.05
1.65 × 10 ¹	27.52 ± 0.64	1.65 × 10 ¹	27.30 ± 1.04

relationship between log CFU/mL and C_T values was as follows: $y = -3.177x + 33.126$, with a R^2 of 0.9958.

The sensitivity of the method was 16.5 CFU/mL corresponding to a detection limit of bacterial concentration in the food product of 165 CFU of the target *Bacillus* spp. per gram of food product.

3.3. Specificity of the RTi-PCR method

RTi-PCR assays were conducted to test the specificity of the primer-probe set using a concentration of 10 ng of purified DNA from microbial strains that were listed in Table 2. Assays were performed in triplicate. All the tested *Bacillus* strains amplified with C_T values in the range of 14–15, whereas all non-*Bacillus* spp. had C_T values above 28.5, which correspond to unspecific amplifications (Fig. 3). Although the 10 ng concentration of purified DNA employed in this assay was high (equivalent to more than 10⁶ CFU/mL) even in the cases of the negative controls, the amplifications of these non-*Bacillus* were unspecific. These results also confirmed that the proposed RTi-PCR assay is adequate for quantification because the quantification limit for *Bacillus* corresponded to a C_T value of 27 (27.52 for standard curves of pure cultured and 27.30 for standard curves of food products) (Table 4). However, the C_T values of the non-*Bacillus* spp. were more than one cycle above that value, indicating that they would be out of the quantification limit of the method developed in this study.

4. Discussion

The investigation of microorganisms able to compromise the quality and safety of foods is a major concern for the food industry and the administration. Among such microorganisms, certain *Bacillus* spp. such as *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* are of relevance, due to their spoilage and/or pathogenic nature, also being able to resist certain preservation methods such as pasteurisation. Accordingly, the aim of this work was to design a primer-probe set for RTi-PCR that allowed the quantification of the above-cited *Bacillus* spp.

Conventional PCR methods have been previously designed by other authors to detect certain species of *Bacillus*, although such studies do not discriminate between *B. cereus* and *Bacillus thuringiensis* (teGiffel et al., 1997). Similarly, specific PCR combined with ARDRA also allowed the identification but not the quantification of *Bacillus* spp. (Wu et al., 2006). Other assays have been proposed for the identification and characterisation of toxigenic *B. cereus* isolates responsible for food poisoning outbreaks (Ghelardi et al., 2002). Nevertheless, and unlike RTi-PCR, conventional PCR does not give any quantitative information, also requiring more time to complete the final visualisation of DNA by electrophoresis. In this work, therefore, a RTi-PCR method was developed to specifically quantify the three most relevant *Bacillus* spp. that may be present in food products.

Concerning RTi-PCR, some authors have proposed methods that use Sybr Green to detect or quantify *Pseudomonas* in fish (Reynisson et al., 2008) or *Corynebacterium casei* in cheese (Monnet et al., 2006). Others have used TaqMan probes to detect and quantify other microorganisms, such as *Leuconostoc mesenteroides* in meat products (Elizaguivel et al., 2008). The detection of *B. cereus* in naturally-contaminated food gelatine has been described (Reekmans et al., 2009). In such study a primer-probe set was designed but with the aim of detecting only *B. cereus*. Likewise, another method was proposed for the detection and quantification of enterotoxigenic *B. cereus* strains in food samples (Martinez-Blanch et al., 2009). Unlike these methods, the primer-probe set proposed in our study allowed the detection and quantification of *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* in a single assay.

The TaqMan-based RTi-PCR procedure was developed using primers and a probe targeted to the 16S rRNA gene. For the design of the probe and primers, the 16S rRNA sequences of the *Bacillus* spp. obtained in this study were comparatively analysed with other sequences downloaded from GenBank. Subsequently, these primers and probes were evaluated for their specificity to quantify *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* and not other bacteria that may be present in the same kind of food products. The results indicated that the amplification of *Bacillus* spp. had C_T values between 14 and 15, whereas amplifications of non-*Bacillus* spp. had a C_T value above 28.5.

Both standard curves constructed from pure cultures and inoculated food had good linearity [R^2 of 0.9969 and R^2 of 0.9958, respectively], results that were similar to those obtained by Martinez-Blanch et al. (2009) with *B. cereus* and slope values of −3.25 and −3.18, respectively. These values were close to the theoretical optimal of −3.32 (Higuchi et al., 1993), which confirms the suitability of this assay for the quantification of *Bacillus* spp. The efficiency of the method was close to 100% (103% and 106% for curves of pure culture and inoculated product, respectively). Moreover, this method was sensitive because the detection limit in both cases was 16.5 CFU/mL (165 CFU/g) in the undiluted original food. Slightly higher detection limits (40 CFU/mL) for

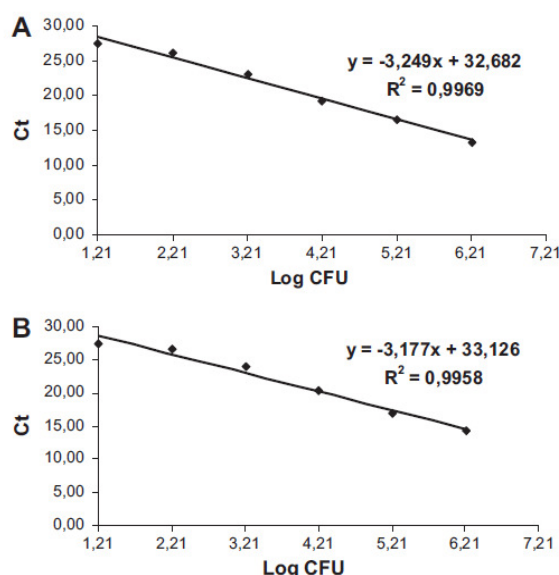


Fig. 2. Standard curves obtained from serial dilutions of *B. cereus*. (A) DNA extracted from a culture in BHI and (B) DNA extracted from artificially contaminated food products.

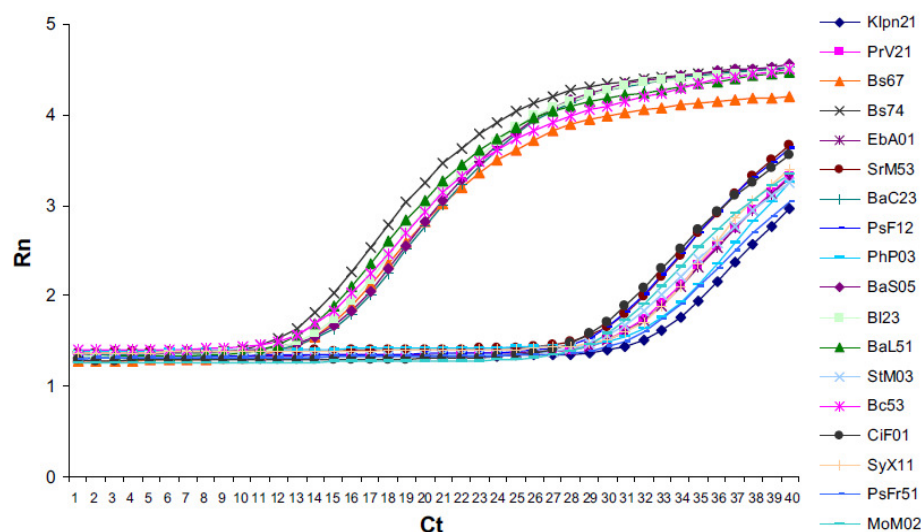


Fig. 3. Amplification of *Bacillus* spp and other non-*Bacillus* spp associated with food products with the proposed RTi-PCR method.

enterotoxigenic *B. cereus* in food samples have been recently described (Martínez-Blanch et al., 2009). Finally, the quantification limit of the method corresponded with an average Ct value of 27.41 (Table 4). Due to the fact that this Ct value is below the value of 28.5 exhibited by non-*Bacillus* spp., the proposed method is well suited to specifically detect and quantify *B. cereus*, *B. licheniformis* or *B. subtilis* in food products.

In summary, to the best of our knowledge, this is the first work that describes a primer-probe set using RTi-PCR assay for the detection and quantification at the same time of *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*, species able to compromise food quality and safety. Accordingly, the proposed method allows the microbiological control of such pathogenic and spoilage sporeformers not only in fresh but also in pasteurised food products.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Francisco Barros (Unidad de Medicina Molecular, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela) for his excellent technical assistance with the 16S rRNA sequencing. This work was funded by the PGIDIT Research Program (Project PGIDIT06PXIB261164PR) of the Xunta de Galicia (Galician Council for Industry Commerce and Innovation). The work of I.C. Fernández-No and K. Böhme is supported by a "María Barbeito" and "Lucas Labrada" research contract from Xunta de Galicia.

References

- Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology* 100, 352–364.
- Angert, E., Clements, K., Pace, N., 1993. The largest bacterium. *Nature* 362, 239–241.
- Elizaquivel, P., Chenoll, E., Aznar, R., 2008. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *FEMS Microbiology Letters* 278, 62–71.
- Encinas, J., SanzGomez, J., GarciaLopez, M., GarciaArmesto, M., Otero, A., 1996. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. *Meat Science* 42, 127–131.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S., 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters* 208, 129–134.

- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M., 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3122–3126.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11, 1026–1030.
- Hosseini, S., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J., 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1392–1403.
- Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8 (6), 257–260.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7046–7052.
- Martínez-Blanch, J., Sanchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2009. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 135, 15–21.
- Monnet, C., Correia, K., Sarthou, A., Irlinger, F., 2006. Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6972–6979.
- Nogva, H., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D., 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4266–4271.
- Oguntuyinbo, F.A., 2007. Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *African Journal of Biotechnology* 6, 163–166.
- Pavic, S., Brett, M., Petric, N., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 56, 20–22.
- Reekmans, R., Stevens, P., Vervust, T., De Vos, P., 2009. An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine: a comparison study. *Letters in Applied Microbiology* 48, 97–104.
- Relman, D., Schmidt, T., MacDermott, R., Falkow, S., 1992. Identification of the uncultured *Bacillus* of Whipple's disease. *New England Journal of Medicine* 327, 293–301.
- Reynisson, E., Lauzon, H., Magnusson, H., Hreggvidsson, G., Marteinson, V., 2008. Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1357–1362.
- Rosenkvist, H., Hansen, A., 1995. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *International Journal of Food Microbiology* 26, 353–363.
- Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kampfer, P., Honkanen-Buzalski, T., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4637–4645.
- Schaeffer, A.B., MacDonald, F., 1933. A simplified method of staining endospores. *Science* 77, 194.
- Sorokulova, I., Reva, O., Smirnov, V., Pinchuk, I., Lapa, S., Urdaci, M., 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rye bread. *Letters in Applied Microbiology* 37, 169–173.

- teGiffel, M., Beumer, R., Klijn, N., Wagendorp, A., Rombouts, F., 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 146, 47–51.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Wattiau, P., Renard, M., Ledent, P., Debois, V., Blackman, G., Agathos, S., 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 816–819.
- Wu, X., Walker, M., Homitzky, M., Chin, J., 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods* 64, 107–119.

3.5. CAPÍTULO 5

Caracterización de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* por espectrometría de masas MALDI-TOF

Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting

I.C. Fernández-No, K. Böhme, M. Díaz-Bao, A. Cepeda, J. Barros-Velázquez and P. Calomata

Enviado a *Electrophoresis* en Noviembre 2011

RESUMEN

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, que incluye especies como *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, son patógenas y ampliamente consideradas como alterantes de los alimentos. El objetivo principal de este trabajo consistió en aplicar Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) para la clasificación e identificación de estas especies de *Bacillus*. En este trabajo se consideró asimismo el análisis genético de polimorfismos (SNPs) en el gen 16S ADNr, y se comparó con los análisis filogenético y filoproteómico. Para ello, se estudió una colección de 52 cepas de *Bacillus* aisladas de alimentos frescos y procesados, así como diversas cepas de referencia de colecciones internacionales. Los espectros y las listas de masas resultantes se compararon, lo que permitió asignar picos característicos tanto a nivel de cepa como a nivel de especie bacteriana. Los resultados mostraron que la técnica MALDI-TOF aporta un enfoque complementario y más poderoso que la secuenciación del gen 16S ADNr en la clasificación correcta de las especies de *Bacillus*, sobre todo para diferenciar *B. subtilis* y *B. cereus* de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, respectivamente. Tanto el análisis MALDI-TOF como el análisis de SNPs proporcionaron información valiosa, tanto a nivel intra e interespecíficas, en las especies de *Bacillus* estudiadas.

ELECTROPHORESIS



Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting

Journal:	<i>Electrophoresis</i>
Manuscript ID:	elps.201100599
Wiley - Manuscript type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	03-Nov-2011
Complete List of Authors:	Fernandez-No, Inmaculada; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Böhme, Karola; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Díaz-Bao, Mónica; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Cepeda, Alberto; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Barros-Velázquez, Jorge; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science Calo-Mata, Pilar; University of Santiago de Compostela, Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science
Keywords:	Bacillus, food safety, MALDI-TOF, SNPs, phyloproteomics, phylogenetics, bacterial identification

SCHOLARONE™
Manuscripts

Wiley-VCH

1
2
3 1 **Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and**
4
5 2 ***Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting**
6
7

8 3
9
10 4
11
12 5 I.C. Fernández-No, K. Böhme, M. Díaz-Bao, A. Cepeda, J. Barros-Velázquez and P.
13
14 6 Calo-Mata
15
16
17 7

18 8
19
20 9 *Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary*
21
22 10 *Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa*
23
24 11 *Carballo Calero s/n, Campus Lugo, E-27002 Lugo, Spain*
25
26
27 12

28
29
30 13 **Corresponding author:** Prof. Dr. Pilar Calo Mata, Department of Analytical
31
32 14 Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of
33
34 15 Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Universitario Norte, E-
35
36 16 27002 Lugo, Spain; Fax: +34982252195; Phone: +3464744274; E-mail:
37
38 17 p.calo.mata@usc.es
39
40
41 18

42
43 19 **Running title:** Characterisation of *Bacillus* spp. by MALDI-TOF PMF
44
45 20
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ELECTROPHORESIS

2

21 **Abstract**

22 Bacteria belonging to the *Bacillus* genus, which includes species such as *Bacillus*
23 *cereus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, are pathogenic and widely
24 considered to be causative agents in the spoilage of food products. The main goal of this
25 work was to apply matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight (MALDI-
26 TOF) mass fingerprinting to the classification of these *Bacillus* species. Genetic
27 analyses based on the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the
28 16S rRNA gene were also applied and compared with phylogenetic and phyloproteomic
29 analyses. A collection of 52 *Bacillus* strains isolated from fresh and processed food and
30 from culture collections were studied and their mass spectra compiled. The resulting
31 mass fingerprints were compared and characteristic peaks at the strain and species levels
32 were assigned. The results showed that MALDI-TOF was a more powerful
33 complementary approach than 16S rRNA sequencing in the accurate classification of
34 *Bacillus* species, especially for differentiating *B. subtilis* and *B. cereus* from *B.*
35 *amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, respectively. MALDI-TOF and SNP analysis
36 were also found to provide valuable information at both intra- and interspecies levels in
37 the *Bacillus* species studied.

39 **Keywords** *Bacillus*, food safety, MALDI-TOF, SNPs, phyloproteomics, phylogenetics,
40 bacterial identification

1. Introduction

Pathogenic and spoilage bacteria are naturally present in foods as indigenous microbiota or are introduced into food products by contamination during processing [1]. Manipulation and packaging of food products can lead to contamination with pathogenic bacteria such as *Bacillus* spp., *Listeria* spp. or *Staphylococcus aureus* [2, 3]. The microbiota present in the final food product may also vary depending on the preservation treatment applied. Unfortunately, the increased demand for minimally processed foods has led to application of weak preservation methods that result in the inhibition of pathogenic Gram-negative bacteria but do not guarantee the destruction of sporofforming Gram-positive bacteria such as *Bacillus* [4, 5].

Bacillus spp. are ubiquitous and diverse in terrestrial and marine ecosystems, which facilitates their contamination in a variety of foods at different stages of the food chain [6]. Remarkably, these species are able to survive pasteurisation and produce endospores in raw and thermally processed foods [7]. Refrigeration does not prevent the microbiological risks associated with these species, some of which can grow at broad pH, temperature and water activity ranges [8]. Thus, there is great concern in the food industry regarding the spoilage and/or pathogenic nature of these bacteria [9].

The genus *Bacillus* includes species such as *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* or *Bacillus subtilis*. *B. cereus* has been recognised to be a causative agent in food poisoning for more than 40 years and has been linked to foodborne emetic and diarrhoeal syndromes [10]. *B. licheniformis* has been associated with a variety of clinical syndromes and food poisoning incidents in humans, bovine toxæmia and abortions [11], and food spoilage incidents such as roty bread [12]. *B. subtilis* is not typically considered a human pathogen but may occasionally contaminate food and

ELECTROPHORESIS

4

1 cause food poisoning, such as in the 2005 outbreak in a kindergarten caused by milk
2 powder [13].

3 An improved understanding of the ecology of *Bacillus* is necessary to prevent or
4 reduce their presence in fresh or heat-treated food products and to increase product shelf
5 life [14]. The ability to identify species and strains of these bacteria in a standardised
6 and reproducible manner is essential. Previous studies have reported difficulties in the
7 identification of certain foodborne *Bacillus* spp., in particular, the differentiation of *B.*
8 *cereus* from *Bacillus thuringiensis* [15, 16] and *B. subtilis* from *Bacillus*
9 *amyloliquefaciens* [17], due to similarities in their 16S rRNA nucleotide sequences.

10 Among the molecular methods recently proposed for microbial characterisation,
11 single nucleotide polymorphism (SNP) analysis has emerged as a useful tool [18, 19].
12 SNP detection and analyses of SNP heterogeneity among or within species may
13 facilitate species identification. However, this method relies on accurate design of DNA
14 primers or probes specific to a strain, species or group of species. More recently, new
15 robust molecular tools based on mass spectrometry (MS) have been employed as
16 complementary analytical approaches for microbial identification. In particular, matrix-
17 assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)
18 has been successfully used for microbial identification purposes and has emerged as a
19 rapid method for the characterisation of bacteria at the genus, species and strain level
20 [8]. MALDI-TOF mass fingerprinting has also proven to be a fast and cost-effective
21 technique for bacterial species differentiation [20, 21].

22 Therefore, the first objective of this work was to evaluate MALDI-TOF mass
23 fingerprinting in the identification of *Bacillus* spp. relevant to the food industry, such as
24 *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis*, and their differentiation from other related
25 *Bacillus* spp. such as *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *Bacillus megaterium* and

1 *Bacillus pumilus*. The results were compared with phylogenetic analysis based on 16S
2 rRNA nucleotide sequencing. A second goal of this study was to explore the presence of
3 SNPs in these *Bacillus* spp. that may be useful for species identification and for the
4 design of specific primers and DNA probes.

5

6 **2. Materials and methods**

7

8 *2.1. Bacterial strains and culture media*

9 A collection of 52 *Bacillus* strains were studied. Thirty-five strains were obtained from
10 our laboratory and were originally isolated from fresh and processed seafood products
11 (Table 1), whereas the remaining 17 were reference strains (Table 2). All strains were
12 reactivated in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, Le
13 Pont de Claix, France) and incubated at 30°C for 24 h. Afterwards, bacterial cultures
14 were grown on Plate Count Agar (PCA, Oxoid, Hampshire, England) at 30°C for 24 h,
15 and single colonies were isolated. All strains were stored at -80°C.

16

17 *2.2. Sequencing of the 16S rRNA gene and phylogenetic analysis*

18 For genomic analysis, bacterial strains were grown in BHI and incubated at 30°C for 24
19 h. Pellets of 1 ml of overnight cultures were obtained by spinning at 7500 rpm for 10
20 min. Bacterial cells were lysed by addition of 180 µL of a lysis solution (20 mg/ml
21 lysozyme in 20 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) (Sigma-Aldrich, Saint
22 Louis, MO) after incubation for 2 h at 37°C. Total genomic DNA was extracted and
23 purified using the DNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), as described
24 elsewhere [22]. A fragment of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the
25 universal primer pair P8FPL/P806R [23, 24]. All PCR assays were carried out on a

ELECTROPHORESIS

6

1 MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, USA) as described by
2
3 Böhme et al. [25]. Prior to sequencing, PCR products were purified with the ExoSAP-
4
5 IT Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Direct sequencing was performed with the
6
7 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The same
8
9 primers used for PCR were also used for sequencing of both strands of the PCR
10
11 products. The sequencing reactions were analysed in an automatic sequencing system
12
13 (ABI 3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems) provided with the POP-7 system.
14
15 The DNA sequences were analysed with Chromas (Griffith University, Queensland,
16
17 Australia) and aligned using ClustalX [26, 27]. The bacterial strains isolated from
18
19 seafood products (Table 1) were identified by searching for sequence homology among
20
21 published reference sequences with the BLAST tool (National Center for Biotechnology
22
23 Information) [28].
24

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted with MEGA 4.0
software [29] using the neighbour-joining method [26] and the Kimura 2-parameter
model with 1000 bootstrap replicates to construct distance-based trees.

2.3. SNP analysis

SNPs in DNA sequences of all the strains under study were carefully reviewed by eye
using the Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia).
Polymorphisms present in both the forward and reverse strands were considered. Once
all sequences were carefully analysed and the SNPs detected, sequence alignment was
accomplished using the ClustalX software [26, 27] and MEGA 4.0 software [29]. Such
alignment allowed for comparisons to be made among strains and facilitated the use of
polymorphisms to identify potential relationships between strains.

1 For each of the strains under study, SNPs at each position were assigned a binary
2 value (present, 1; absent, 0) and plotted in a table. Phylogenetic relationships among
3 strains based on the SNP analysis were then analysed using the Statgraphics® Plus v5.1
4 software (Rockville, MA, USA), a cluster analysis based on the Ward Algorithm.

5

6 2.4. Proteomic analysis by MALDI-TOF MS

7 For MALDI-TOF MS analysis, small soluble proteins were extracted from intact
8 bacterial cells using a fast method [30]. Bacterial strains were grown on PCA at 30°C
9 for 24 h. One 1-μL loop of each bacterial culture was harvested and placed in 100 μL of
10 a solution consisting of 50% acetonitrile (ACN, Merck, Darmstadt, Germany) and 1%
11 aqueous trifluoroacetic acid (TFA; Acros Organics, Morris Plains, NJ). These solutions
12 were then mixed by vortexing. After centrifugation at 8000 rpm for 10 min, the
13 supernatants were transferred to new tubes and stored at -20°C until analysis. An aliquot
14 (1 μL) of each sample solution was mixed with 10 μL of a matrix solution consisting of
15 10 mg of α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α -CHCA) in 1 mL of 50% ACN and 2.5%
16 aqueous TFA. From this final solution of sample and matrix, an aliquot (1 μL) was
17 manually deposited onto a stainless steel plate and allowed to dry at room temperature.
18 Mass spectra were obtained using a Voyager DE STR MALDI-TOF Mass Spectrometer
19 (Applied Biosystems) operating in a linear mode and extracting positive ions with an
20 accelerating voltage of 25,000 V and delay time of 350 ns. The grid voltage and guide
21 wire were set to 95% and 0.05%, respectively. Each spectrum was the accumulated sum
22 of at least 1,000 laser shots, which were obtained from 10 different regions and
23 manually selected from the same sample spot in a range of 1,500 - 15,000 Da.

24 For every strain, two extractions were carried out, and both extracts were measured
25 in duplicate, thus giving four spectra for each bacterial strain. The spectra were

ELECTROPHORESIS

8

1 externally calibrated using a mixture of 1 pmol/μL oxidised B chain of insulin and 1
2 pmol/μL bovine insulin (Sigma-Aldrich) and then analysed with DataExplorer software
3 (Version 4.0.0.0). Mass spectra were baseline-corrected and noise-filtered. The data lists
4 containing m/z values were extracted from the mass spectra including signals with
5 relative intensities above 2%. The obtained peak mass lists were analysed and compared
6 using peaks in the mass range of 2,000-10,000 Da because of the good reproducibility
7 of the spectral profile in that mass range. Mass lists were further processed with the free
8 web-based application, SPECLUST, which is available at
9 <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> [31]. The web application allowed calculation of
10 the differences between peak lists and the determination of common peak masses. This
11 tool was used to examine the four spectra of each sample, extracting representative
12 peaks present in all four spectra and taking into account a peak match score greater than
13 0.7, which corresponds to a measurement error of ± 5 Da.

3. Results

3.1. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene

18 All strains were subjected to genetic analysis using universal primers specific for the
19 16S rRNA gene. The 800-bp amplicons obtained for each isolate were analysed and
20 compared with other reference strains from GenBank using the BLAST tool, as shown
21 in Table 1. The strains identified as *Bacillus* spp.¹ exhibited high similarity to both *B.*
22 *cereus* and *B. thuringiensis* and were unable to be differentiated by this analysis. This
23 group will hereafter be referred to as the *B. cereus* group. The results from BLAST
24 analyses allowed the unambiguous identification of *B. licheniformis*, *B. megaterium* and
25 *B. subtilis* strains. However, the sequences of these *Bacillus* spp.² strains exhibited high

homology to *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* (Table 1). This group will hereafter be referred to as the *B. cereus* group.

The sequences of all studied strains were aligned (Figure 1S), and cluster analysis was performed to elucidate phylogenetic relationships (Figure 1). This analysis clearly revealed the difficulties in differentiating between strains belonging to the *B. subtilis* group, as strains in this group were assigned to cluster A along with the reference strains *B. subtilis* and *B. licheniformis* (Figure 1). Similar results were obtained for the strains belonging to the *B. cereus* group, which were assigned to cluster E along with *B. cereus* and *B. thuringiensis* (Figure 1). On the other hand, strains belonging to *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. megaterium* species were well grouped as clusters B, C and D, respectively (Figure 1). The phylogenetic tree displayed two groups separated in two different branches (I and II, Figure 1), the bigger branch (I) showing three clusters corresponding to the *B. subtilis* group, *B. licheniformis* and *B. pumilus* (clusters A, B and C, respectively, in Figure 1) and the smaller branch (II) showing two clusters corresponding to *B. megaterium* and the *B. cereus* group (clusters D and E, respectively, in Figure 1).

3.2. SNP analysis

All sequences were carefully analysed, and polymorphic sites were considered when two different bases were detected at the same site in the sequence. Examples of the different SNP sites detected in the sequences are shown in Figure 2S.

Alignment of all the sequences (Figure 1S) allowed comparisons among strains and facilitated the use of polymorphisms to elucidate potential relationships among the strains. Figure 1S denotes consensus sequences with the symbol “.” and SNPs with “y”, “r”, “w” or “m” (Figure 1S).

ELECTROPHORESIS

10

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Tables 3 and 4 show the types of polymorphisms detected. The general position of
2 each SNP was assigned for each of the sequences relative to the alignment. Sequence
3 analysis allowed the detection of polymorphic sites in 42 strains. The most frequent
4 type of polymorphism found was the transition type T>C (Y), followed by R (A>G or
5 G>A). Polymorphism type “Y” was observed at site 173 in eight out of 16 strains
6 belonging to the *B. cereus* group (Table 4) and at sites 212 and 476 in the majority of *B.*
7 *licheniformis* strains (Table 3). Polymorphism type “R” was observed at site 278 in the
8 majority of strains belonging to the *B. subtilis* group (Table 3).

9 A binary table was constructed from the results in Tables 3 and 4 to compare the
10 presence (1) or absence (0) of each SNP in each strain. Phylogenetic relationships were
11 analysed using the Statgraphics Plus 5.1 software (Rockville, MA, USA), a
12 bioinformatics tool that performs hierarchical cluster analysis using the Ward method
13 (Figure 3S). Sequences were grouped depending on whether they possessed SNPs at
14 specific sites and based on the number of SNPs present in each sequence. The majority
15 of *B. subtilis* and *B. licheniformis* strains were grouped together, as most *B. subtilis*
16 strains possessed the SNP type “R” at site 278, whereas the majority of *B. licheniformis*
17 strains possessed the SNP type “Y” at sites 212 and 476. In the cluster, the first branch
18 corresponds to strains that lacked polymorphisms in their sequences (Figure 3S). A
19 second branch was divided into groups corresponding to strains bearing one to three
20 polymorphisms. A third branch contained 10 of the 12 *B. licheniformis* strains (Figure
21 3S).

22 Several conclusions can be drawn from the SNP analysis. SNP type “Y” at sites 212
23 and 476 seems to be characteristic of *B. licheniformis*. Nine of the 12 *B. licheniformis*
24 species had cytosine at SNP site 212, whereas three had thymine at the same position.
25 The SNP at site 476 was present in 10 out of 12 *B. licheniformis* species analysed.

Polymorphism type “R” at site 278 seems to be characteristic of the *B. subtilis* group, as it was present in 12 out of 19 species from this group. The three strains isolated from fresh fish (Seab10, Seab 21 and 20MC1) did not possess any polymorphisms.

Other SNPs (“y”, “r”, “w” or “m”) found in the alignment in Figure 1S did not appear to be relevant markers for the identification of *Bacillus* strains. Nevertheless, the detection and identification of these polymorphisms was useful for intraspecies differentiation.

3.3 Analysis by MALDI-TOF PMF and construction of a phyloproteomic cluster

Bacterial spectral profiles were obtained and specific mass lists generated by calculating the arithmetic means for the m/z values of the four replicates (data not shown). Standard deviations were less than 5 Da in the mass range above 7000 Da and less than 3 Da in the lower mass range. Comparison of the peak mass lists using the SPECLUST software revealed characteristic peak masses at both species and genus level (Table 5). Comparison of spectral profiles revealed that strains belonging to *B. licheniformis*, *B. megaterium* and *B. pumilus* showed similar intraspecies. In contrast, *B. cereus* and *B. subtilis* exhibited more spectral variability at the intraspecies level (Table 5). The strains were classified in eight different groups based on the similarity of peak mass lists of each spectrum (A1, A2, B, C, D, E1, E2, and E3; Table 5, Figure 2). As expected, a remarkable intraspecies similarity was observed for the spectral profiles with a significant number of peaks in common. Table 5 shows all characteristics peaks for each group and highlights the intraspecies similarities described above. At least one species-specific peak mass was identified for each bacterial species. For example, the peak with an m/z value of 7716 was specific for the *B. subtilis* group (A1 and A2). Similarly, the peaks with m/z values of 3553, 4610, 5830 and 6743 corresponded to *B. megaterium*.

ELECTROPHORESIS

12

(cluster C), and peaks with m/z values of 3620, 6617 and 7238 corresponded to *B. pumilus* (cluster D). *B. licheniformis* strains (B in Table 5 and Figure 2) exhibited very similar spectral profiles at the intraspecies level but also shared peaks, such as those with m/z values of 3045 and 9892, with other *Bacillus* spp. Thus, no species-specific marker could be identified for *B. licheniformis*.

In the *B. cereus* group (E1, E2 and E3), peaks with m/z values of 2168 and 4332 were characteristic of the species, whereas the peak with an m/z value of 4305 was widely present in all *Bacillus* spp. except for the *B. cereus* group (Table 5). Different characteristic peaks were found for *B. subtilis* (A1) and *B. amyloliquefaciens* strains (A2), allowing for differentiation between these two species of the *B. subtilis* group (Table 5). In summary, characteristic peaks were found for the *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus* and *B. cereus* groups.

The phyloproteomic dendrogram in Figure 2 shows *Bacillus* spp. were divided into two main groups (I and II). The smaller branch (II) comprised the *B. cereus* group, whereas the remaining *Bacillus* spp. were placed in the larger branch (I). Branch I was divided into two sub-branches, one for *B. subtilis* strains and the other containing two clusters, one for *B. licheniformis* and the other for *B. megaterium* and *B. pumilus*. The reference strain *B. amyloliquefaciens* ATCC 23842 was grouped together with *B. subtilis* but in a different branch than the *B. subtilis* reference strains. Accordingly, the strains of the *B. subtilis* group (cluster A2) were considered *B. amyloliquefaciens*. Three clusters were obtained for the *B. cereus* group (E). Remarkably, cluster E3 grouped all *B. thuringiensis* with *B. cereus* ATCC 14579.

In conclusion, the differentiation of species belonging to *B. cereus* and *B. subtilis* groups was only possible with the phyloproteomic approach but not with phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene.

4. Discussion

2

3 4.1. Comparison of phyloproteomic and phylogenetic approaches in the identification of
4 *Bacillus* spp.

5 Genetic and proteomic analyses were both able to facilitate the classification of *Bacillus*
6 spp. into two large groups (I and II). However, some major differences were noted.
7 Phylogenetic analyses provided a first group (I) that included the *B. subtilis* group (A),
8 *B. licheniformis* (B) and *B. pumilus* (C) (Figure 1) and a second group (II) that included
9 strains belonging to *B. megaterium* (D) and *B. cereus* (E). In contrast, the
10 phyloproteomic tree grouped *B. megaterium* strains (C in Figure 2) with *B. subtilis*, *B.*
11 *licheniformis* and *B. pumilus* (clusters A, B and D, respectively, in Figure 2).
12 Phyloproteomic analysis allowed the separation of strains belonging to the *B. cereus*
13 group (E in Figure 2) with respect to other *Bacillus* spp. studied.

14 Notably, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene failed to differentiate between
15 species belonging to the *B. cereus* group (*B. cereus* and *B. thuringiensis*, E in Figure 1)
16 and species belonging to the *B. subtilis* group (*B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*, A in
17 Figure 1). Our results confirm previous reports on the difficulties in distinguishing *B.*
18 *cereus* from *B. thuringiensis* [15, 16] and *B. subtilis* from *B. amyloliquefaciens* [17] due
19 to similarities in their 16S rRNA nucleotide sequences.

20 Remarkably, MALDI-TOF analysis allowed the differentiation of bacterial species
21 belonging to the *B. subtilis* group (*B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*) and those
22 belonging to the *B. cereus* group (*B. cereus* and *B. thuringiensis*). Thus, the species-
23 specific mass peaks compiled in Table 5 can be considered useful biomarkers for the
24 rapid identification and classification of the *Bacillus* genus, complementing two studies
25 recently reported by other groups [32, 33]. These results confirm the accuracy of the

ELECTROPHORESIS

14

1 MALDI-TOF MS fingerprinting approach in identifying foodborne *Bacillus* strains.
2 Moreover, MALDI-TOF appeared to be more useful than 16S rRNA sequencing in
3 accurately classifying *B. cereus* and *B. subtilis* groups and also provided valuable
4 information at the intraspecies level.

6 4.2. SNP analysis in *Bacillus* spp.

7 The use of SNPs in microbial characterisation has many advantages due to their
8 unambiguous nature and the multitude of platforms that have been developed to assay
9 such markers. SNPs are evolutionarily stable [34] and amenable to high-throughput
10 detection methods, such as real time PCR, pyrosequencing and mass spectrometry [35].
11 In bacterial pathogens, a variety of SNPs have been discovered that belong to the
12 category of pathogenicity-enhancing or pathoadaptive mutations. These mutations are
13 genetic alterations in regulatory or structural genes that provide a selective advantage
14 during the course of a single infection, epidemic spread or long-term evolution of
15 virulence [36]. Although many pathoadaptive mutations are actually loss of function
16 genes, adaptive SNPs usually result in only a minimal alteration in the structure of
17 encoded proteins. It is important to emphasise that the presence of SNPs as an
18 adaptation tool to environmental changes can be critical for the survival and expansion
19 of bacterial populations [16].

20 Ribosomal genes have been widely used as phylogenetic markers because of their
21 universal distribution, high sequence conservation, functional stability, ease of
22 sequencing and specific features in their primary and secondary structures resulting
23 from stretches of different sequence variabilities [37]. The genes encoding ribosomal
24 RNA are organised into multiple ribosomal RNA operons (*rrn*) in the majority of
25 bacteria. Thus, there are multiple rRNA gene copies in each genome that exhibit small

4. Discussion

2

4.1. Comparison of phyloproteomic and phylogenetic approaches in the identification of *Bacillus* spp.

Genetic and proteomic analyses were both able to facilitate the classification of *Bacillus* spp. into two large groups (I and II). However, some major differences were noted. Phylogenetic analyses provided a first group (I) that included the *B. subtilis* group (A), *B. licheniformis* (B) and *B. pumilus* (C) (Figure 1) and a second group (II) that included strains belonging to *B. megaterium* (D) and *B. cereus* (E). In contrast, the phyloproteomic tree grouped *B. megaterium* strains (C in Figure 2) with *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. pumilus* (clusters A, B and D, respectively, in Figure 2). Phyloproteomic analysis allowed the separation of strains belonging to the *B. cereus* group (E in Figure 2) with respect to other *Bacillus* spp. studied.

Notably, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene failed to differentiate between species belonging to the *B. cereus* group (*B. cereus* and *B. thuringiensis*, E in Figure 1) and species belonging to the *B. subtilis* group (*B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*, A in Figure 1). Our results confirm previous reports on the difficulties in distinguishing *B. cereus* from *B. thuringiensis* [15, 16] and *B. subtilis* from *B. amyloliquefaciens* [17] due to similarities in their 16S rRNA nucleotide sequences.

Remarkably, MALDI-TOF analysis allowed the differentiation of bacterial species belonging to the *B. subtilis* group (*B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*) and those belonging to the *B. cereus* group (*B. cereus* and *B. thuringiensis*). Thus, the species-specific mass peaks compiled in Table 5 can be considered useful biomarkers for the rapid identification and classification of the *Bacillus* genus, complementing two studies recently reported by other groups [32, 33]. These results confirm the accuracy of the

ELECTROPHORESIS

14

1 MALDI-TOF MS fingerprinting approach in identifying foodborne *Bacillus* strains.
2 Moreover, MALDI-TOF appeared to be more useful than 16S rRNA sequencing in
3 accurately classifying *B. cereus* and *B. subtilis* groups and also provided valuable
4 information at the intraspecies level.

4.2. SNP analysis in *Bacillus* spp.

5 The use of SNPs in microbial characterisation has many advantages due to their
6 unambiguous nature and the multitude of platforms that have been developed to assay
7 such markers. SNPs are evolutionarily stable [34] and amenable to high-throughput
8 detection methods, such as real time PCR, pyrosequencing and mass spectrometry [35].
9 In bacterial pathogens, a variety of SNPs have been discovered that belong to the
10 category of pathogenicity-enhancing or pathoadaptive mutations. These mutations are
11 genetic alterations in regulatory or structural genes that provide a selective advantage
12 during the course of a single infection, epidemic spread or long-term evolution of
13 virulence [36]. Although many pathoadaptive mutations are actually loss of function
14 genes, adaptive SNPs usually result in only a minimal alteration in the structure of
15 encoded proteins. It is important to emphasise that the presence of SNPs as an
16 adaptation tool to environmental changes can be critical for the survival and expansion
17 of bacterial populations [16].

18 Ribosomal genes have been widely used as phylogenetic markers because of their
19 universal distribution, high sequence conservation, functional stability, ease of
20 sequencing and specific features in their primary and secondary structures resulting
21 from stretches of different sequence variabilities [37]. The genes encoding ribosomal
22 RNA are organised into multiple ribosomal RNA operons (*rrn*) in the majority of
23 bacteria. Thus, there are multiple rRNA gene copies in each genome that exhibit small

1 differences. Nucleotide sequence variability of rRNA operons does not invalidate
2 bacterial classification based on 16S rRNA sequences [38].

3 The number of copies of the ribosomal operon in the bacterial genome varies
4 considerably from one to 15 but is relatively constant at the species, genus and even
5 family levels. The ribosomal RNA database
6 (<http://ribosome.mmg.msu.edu/rndb/index.php>) compiles the number of rRNA genes in
7 bacteria and *archaea*. Other authors have reported seven copies of the 16S rRNA gene
8 in *E. coli*, raising the possibility that potential mutations are masked by wild-type copies
9 [39]. In the case of *Bacillus*, up to 14 ribosomal RNA operons have been found (Table
10 1S).

11 A comparison of the sequences from the strains in our study with those from
12 different operons of the same strain deposited in the *rrn* database reveals that some
13 SNPs have already been reported, such as the SNP T>C (Y) at sites 212 and 476 in *B.*
14 *licheniformis* and the SNP A>G (R) at site 278 in *B. subtilis* (data not shown). Thus,
15 these SNPs are frequently found in such species and might be relevant for bacterial
16 identification. On the other hand, the present work describes, for the first time, different
17 polymorphisms in the 16S rRNA gene in *Bacillus* reference and wild-type strains
18 (Tables 3 and 4), which may be relevant for species identification in this genus.

19 Other authors have proposed a method based on five SNPs to divide the
20 *Streptococcus agalactiae* group B into different subgroups [40]. This study was
21 consistent with previous reports and has found intraspecies differences among strains
22 belonging to the same species. In our study, several subgroups have been defined based
23 on polymorphism analysis, therefore complementing the information provided by
24 phylogenetic analysis (Tables 3 and 4, Figure 3S). Other authors have also
25 demonstrated that a small group of SNPs can be used to define genetic groups.

Moorhead *et al.* [41] used a phylogenetic approach to identify a small number of diagnostic SNPs in the *sigB* gene. Likewise, Keim *et al.* [42] expanded this concept and proposed the idea of a “canonical SNP” that can be used to efficiently identify a point in the evolutionary history of a species.

In summary, this work employed novel strategies, including nucleotide sequencing, phylogenetic analysis, SNP analysis and MALDI-TOF mass fingerprinting, in the identification of relevant foodborne *Bacillus* spp. Proteomic approaches may be more informative in differentiating between species, especially when genetic analysis is inconclusive, such is the differentiation of *B. subtilis* from *B. amyloliquefaciens* and *B. cereus* from *B. thuringiensis*. Moreover, SNP analysis provided valuable information about novel polymorphisms in the 16S rRNA gene of *Bacillus* spp. that should be considered when designing primers and probes for multiplex-PCR, real-time PCR and microarray systems.

Acknowledgments

This work was funded by project 10PXIB261045PR from Xunta de Galicia and by project AGL2010-19646 from the Spanish Ministry of Science and Technology. I.C. Fernandez-No and K. Bohme are recipients of “Lucas Labrada” and “Maria Barbeito” research contracts from Xunta de Galicia, respectively.

5. References

- [1] Huss, H., Reilly, A., Ben Embarek, P. *Food control* 2000, 11, 149-156.
- [2] Gram, L., Dalgaard, P. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 262-266.
- [3] Parihar, V., Barbuddhe, S., Danielsson Thm, M., Tham, W. *Food control* 2008, 19, 566-569.

- 1 [4] Paludan Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H., Gram, L. *Int. J. Food Microbiol.* 1998,
- 2 39, 155-166.
- 3 [5] Gram, L., Huss, H. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 33, 121-137.
- 4 [6] Oguntinyinbo, F. *African journal of biotechnology* 2007, 6, 163-166.
- 5 [7] Durak, M., Fromm, H., Huck, J., Zadoks, R., Boor, K. *J. Food Sci.* 2006, 71, M50-
- 6 M56.
- 7 [8] van Baar, B. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, 24, 193-219.
- 8 [9] Franz, C. M. A. P., von Holy, A. *Food Microbiol.* 1996, 13, 165-174.
- 9 [10] Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C. *et al. FEMS Microbiol. Lett.*
- 10 2002, 208, 129-134.
- 11 [11] Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kampfer, P., Honkanen-
- 12 Buzalski, T. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4637-4645.
- 13 [12] Sorokulova, I., Reva, O., Smirnov, V., Pinchuk, I. *et al. Lett. Appl. Microbiol.*
- 14 2003, 37, 169-173.
- 15 [13] Pavic, S., Brett, M., Petric, N., Lastre, D. *et al. Archiv für Lebensmittelhygiene*
- 16 2005, 56, 20-22.
- 17 [14] Meer, R., Baker, J., Bodyfelt, F., Griffiths, M. *J. Food Prot.* 1991, 54, 969-979.
- 18 [15] Priest, F. G., Kaji, D. A., Rosato, Y. B., Canhos, V. P. *Microbiology* 1994, 140,
- 19 1015-1022.
- 20 [16] Chen, M., Tsen, H. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 912-919.
- 21 [17] Wang, L., Lee, F., Tai, C., Kasai, H. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, 57, 1846-
- 22 1850.
- 23 [18] Kwok, P., in: Anonymous *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd 2001.
- 24 [19] Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A. *Genetics selection evolution*
- 25 2002, 34, 275-305.

ELECTROPHORESIS

18

- [20] Giebel, R., Worden, C., Rust, S., Kleinheinz, G. *et al. Advances in Applied microbiol.* 2010, 71, 149-184.
- [21] Lay, J. *Mass Spectrom. Rev.* 2001, 20, 172-194.
- [22] Campos, C., Rodriguez, O., Calo Meta, P., Prado, M., Barros Velazquez, J. *Food Res. Int.* 2006, 39, 356-364.
- [23] Relman, D., Schmidt, T., MacDermott, R., Falkow, S. *N. Engl. J. Med.* 1992, 327, 293-301.
- [24] Angert, E., Clements, K., Pace, N. *Nature* 1993, 362, 239-241.
- [25] Böhme, K., Fernandez-No, I., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J. *et al. Journal of proteome research* 2010, 9, 3169-3183.
- [26] Saitou, N., Nei, M. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406-425.
- [27] Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4876-4882.
- [28] Altschul, S., Gisch, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403-410.
- [29] Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. *Briefings in Bioinformatics* 2008, 9, 299-306.
- [30] Böhme, K., Fernandez No, I., Barros Velazquez, J., Gallardo, J. *et al. Analytical Methods* 2010, 2, 1941-1947.
- [31] Alm, R., Johansson, P., Hjerno, K., Emanuelsson, C. *et al. Journal of proteome research* 2006, 5, 785-792.
- [32] Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Staemmler, M., Siegbrecht, E. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 7229-7242.
- [33] Hotta, Y., Sato, J., Sato, H., Hosoda, A., Tamura, H. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5222-5230.

- 1
2
3 [34] Pearson, T., Busch, J., Ravel, J., Read, T., Rhoton, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*
4
5 A. 2004, *101*, 13536-13541.
6
7 [35] Easterday, W., Van Ert, M., Simonson, T., Wagner, D. *et al. J. Clin. Microbiol.*
8
9 2005, *43*, 1995-1997.
10
11 [36] Sokurenko, E., Hasty, D., Dykhuizen, D. *Trends Microbiol.* 1999, *7*, 191-195.
12
13 [37] Tourova, T. *Microbiology* 2003, *72*, 389-402.
14
15 [38] Pillidge, C., Sheehy, L., Shihata, A., Pu, Z. *et al. Int. Dairy J.* 2009, *19*, 222-227.
16
17 [39] Qin, D., Abdi, N., Fredrick, K. *RNA* 2007, *13*, 2348-2355.
18
19 [40] Honsa, E., Fricke, T., Stephens, A., Ko, D., Kong, F. *BMC microbiology* 2008, *8*.
20
21 [41] Moorhead, S., Dykes, G., Cursons, R. *J. Microbiol. Methods* 2003, *55*, 425-432.
22
23 [42] Keim, P., Van Ert, M. N., Pearson, T., Vogler, A. J. *et al. Infection, Genetics and*
24
25
26
27 *Evolution* 2004, *4*, 205-213.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ELECTROPHORESIS

20

1 Figure legends

2

3 **Figure 1.** Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Bacillus* spp. using the
4 neighbour-joining method. Numbers above and below branches indicate bootstrap
5 values from neighbour-joining analysis. Group **A** (*B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*),
6 group **B** (*B. licheniformis*), group **C** (*B. pumilus*), group **D** (*B. megaterium*), group **E**
7 (*B. cereus*/*B. thuringiensis*).

8

9 **Figure 2.** Cluster analysis of the peak mass lists of all studied strains based on the
10 average group method performed by means of the software Statgraphics Plus v5.1.

Table 1. *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* strains isolated from fresh and processed seafood considered in this study.

Code	Identified species by DNA	Origen
20MC1	<i>Bacillus</i> spp. ¹	fresh albacora tuna
Bc21	<i>Bacillus</i> spp. ¹	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bc53	<i>Bacillus</i> spp. ¹	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bc54	<i>Bacillus</i> spp. ¹	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bc55	<i>Bacillus</i> spp. ¹	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bc78	<i>Bacillus</i> spp. ¹	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Proc3T9	<i>Bacillus</i> spp. ¹	pasteurized and refrigerated seafood product
ProcB2	<i>Bacillus</i> spp. ¹	pasteurized and refrigerated seafood product
Seab10	<i>Bacillus</i> spp. ¹	fresh blackspot seabream
Seab21	<i>Bacillus</i> spp. ¹	fresh blackspot seabream
1Pesc	<i>Bacillus licheniformis</i>	pasteurized and refrigerated seafood product
B113	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B120	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B13	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B131	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B132	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B133	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B136	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B140	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
B142	<i>Bacillus licheniformis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
RPesc	<i>Bacillus megaterium</i>	pasteurized and refrigerated seafood product
Bs66	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs67	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs68	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs69	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs70	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs80	<i>Bacillus</i> spp. ²	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Proc5	<i>Bacillus</i> spp. ²	pasteurized and refrigerated seafood product
Proc7a	<i>Bacillus</i> spp. ²	pasteurized and refrigerated seafood product
Bs73	<i>Bacillus subtilis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Bs77	<i>Bacillus subtilis</i>	spoiled pasteurized and refrigerated seafood product
Proc6a	<i>Bacillus subtilis</i>	pasteurized and refrigerated seafood product
Proc6b	<i>Bacillus subtilis</i>	pasteurized and refrigerated seafood product
Proc721	<i>Bacillus subtilis</i>	pasteurized and refrigerated seafood product
ProcB6c	<i>Bacillus subtilis</i>	pasteurized and refrigerated seafood product

¹*Bacillus cereus* /*B. thuringiensis* (*B. cereus* group)

²*Bacillus subtilis* /*B. amyloliquefaciens* (*B. subtilis* group)

Table 2. Reference strains considered in this study.

Code	Bacterial strain	Origin	NCBI code
BaA81	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	CECT 493	JF749277
BaC23	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14893	CECT 4014	GQ911551
BaC27	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	CECT 193	JF749281
BaC28	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	CECT 5050	AE016877
BaL51	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	CECT 20	GQ911552
BaL52	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811	CECT 491	JF749281
BaM61	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 25848	CECT 44	GQ911553
BaM62	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	CECT 4313	JF749282
BaP31	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	CECT 29 T	GQ911554
BaP33	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	CECT 152	JF749284
BaS06	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	CECT 39	JF749278
BaS07	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774	CECT 35	JF749285
BaS08	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9524	CECT 371	JF749286
BaS05	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	CECT 356	GQ911555
BaT71	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	CECT 197	GQ911556
BaT72	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 35866	CECT 4497	JF749279
BaT73	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	CECT 4454	JF749283

1 **Table 3.** SNPs detected in strains belonging to the phylogenetic tree-branch I.

Code	Species	Site (polymorphism type)
Bs69	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
Bs70	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
Bs66	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
Bs68	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
Bs67	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
BaS07	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774	264 (T>C), 468 (T>C)
Bs73	<i>Bacillus subtilis</i>	278 (A>G)
Bs80	<i>Bacillus</i> spp. ¹	278 (A>G)
BaS06	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	468 (T>C)
BaS08	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9524	264 (T>C), 278 (A>G), 458 (A>G)
Proc721	<i>Bacillus subtilis</i>	278 (A>G), 477 (T>C)
Bs77	<i>Bacillus subtilis</i>	278 (A>G)
Proc7a	<i>Bacillus</i> spp. ¹	177 (T>C)
Proc6b	<i>Bacillus subtilis</i>	278 (A>G), 659 (A>G)
Proc5	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
ProcB6c	<i>Bacillus subtilis</i>	—
Proc6a	<i>Bacillus subtilis</i>	477 (T>C)
BaA81	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	194 (A>G)
BaS05	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	278 (A>G)
BI40	<i>Bacillus licheniformis</i>	258 (G>A), 476 (T>C)
BaL51	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	212 (T>C), 224 (A>G), 476 (T>C)
BI20	<i>Bacillus licheniformis</i>	212 (T>C), 224 (A>G), 476 (T>C)
BI32	<i>Bacillus licheniformis</i>	176 (T>A), 195 (A>T), 213 (C>A), 258 (G>A), 468 (T>C), 476 (T>C), 592 (T>C), 593 (T>C)
BI36	<i>Bacillus licheniformis</i>	278 (A>G)
BI31	<i>Bacillus licheniformis</i>	66 (T>C), 212 (T>C), 476 (T>C)
BI42	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
BI13	<i>Bacillus licheniformis</i>	212 (T>C), 224 (A>G), 476 (T>C)
IPesc	<i>Bacillus licheniformis</i>	66 (T>C), 212 (T>C), 476 (T>C)
BaL52	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811	66 (T>C), 212 (T>C), 476 (T>C)
BI3	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
BI33	<i>Bacillus licheniformis</i>	66 (T>C), 212 (T>C), 224 (A>G), 476 (T>C)
BaP31	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	—
BaP33	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	224 (A>G)

2 ¹*Bacillus subtilis* /*B. amyloliquefaciens* (*B. subtilis* group)

ELECTROPHORESIS

24

3 **Table 4.** SNPs detected in strains belonging to the phylogenetic tree-branch II.

Code	Species	Site (polymorphism type)
Rpesc	<i>Bacillus megaterium</i>	278 (A>C)
BaM61	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 25848	460 (A>G), 473 (T>C)
BaM62	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	460 (A>G), 473 (T>C)
Bac23	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	173 (T>C)
BaT71	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	173 (T>C), 465 (A>G)
Bc54	<i>Bacillus</i> spp. ¹	173 (T>C)
Bc21	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
Seab10	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
Seab21	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
ProcB2	<i>Bacillus</i> spp. ¹	173 (T>C)
Bc55	<i>Bacillus</i> spp. ¹	173 (T>C)
BaC28	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	—
BaT73	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	118 (T>C), 173 (T>C), 183(T>C)
Bc78	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
Bc53	<i>Bacillus</i> spp. ¹	173 (T>C)
BaC27	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	173 (T>C), 183(T>C), 184 (A>G), 193 (A>G)
Proc3T9	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—
BaT72	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 35866	183(T>C)
20MC1	<i>Bacillus</i> spp. ¹	—

4 ¹*Bacillus cereus* /*B. thuringiensis* (*B. cereus* group)

Table 5. Characteristic peak masses of spectral groups^a.

A1	A2	B	C	D	E1	E2	E3
-	-	2056	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	2168	2168
-	-	-	-	-	2414	-	-
2745	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	2984	-	-
-	-	3021	-	3021	-	-	-
3045	-	3045	3045	3045	-	-	-
-	3058	-	-	-	-	-	-
-	-	-	3075	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	3089
-	-	-	-	-	-	-	3116
-	-	-	3131	-	-	-	-
-	-	3253	-	-	-	-	-
-	-	-	3553	-	-	-	-
-	-	-	-	3620	-	-	-
-	-	-	-	-	4182	-	-
4305	4305	4305	4305	4305	-	-	-
-	-	-	-	-	-	4332	4332
-	-	-	-	-	4518	-	-
-	-	-	4610	-	-	-	-
-	-	-	-	-	4704	-	-
-	-	-	-	-	4753	-	-
-	-	-	-	-	-	4992	4992
-	-	-	5205	-	-	-	-
-	5278	-	-	-	-	-	-
-	-	-	5830	-	-	-	-
-	-	5896	-	-	-	-	-
6506	6506	-	-	-	-	-	-
6599	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	6617	-	-	-
6676	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	6743	-	-	-	-
-	-	-	-	7238	-	-	-
7716	7716	-	-	-	-	-	-
9892	9892	9892	-	-	-	-	-

^aPeak masses are presented as $[M + H]^+$ values. Species-specific or unique peak masses for every spectral group are highlighted in bold.

Supplementary Material

2

3 **Table 1S.** Information on the number of operons of different *B cereus*, *B licheniformis*,
4 *B pumilus*, *B subtilis* and *B thuringiensis* strains obtained from the *rrndb* database.

5

6 **Figure 1S:** Sequence alignment of studied strains using the MEGA 4.0 software. The
7 letter “y”, “r”, “m” and “w” correspond to polymorphisms (t/c), (g/a), (a/c) and (a/t)
8 respectively.

9

10 **Figure 2S.** Chromatograms showing different types of SNPs in the 16S rRNA
11 sequence. The sequence variation is indicated by an arrow. The colors of the peaks
12 reflect different bases, where T is blue, C is black, G is green and A is red. Nucleotide
13 sequencing revealed substitution of A by T (chromatogram 1), G by A (chromatogram
14 2), T by C (chromatogram 3) and A by C (chromatogram 4).

15

16 **Figure 3S.** Cluster analysis of SNPs displayed in Tables 3 and 4. the presence or
17 absence of each SNP in each strain is referred as “1” or “0”, respectively.

18

19

20

21

22

23

Page 27 of 28

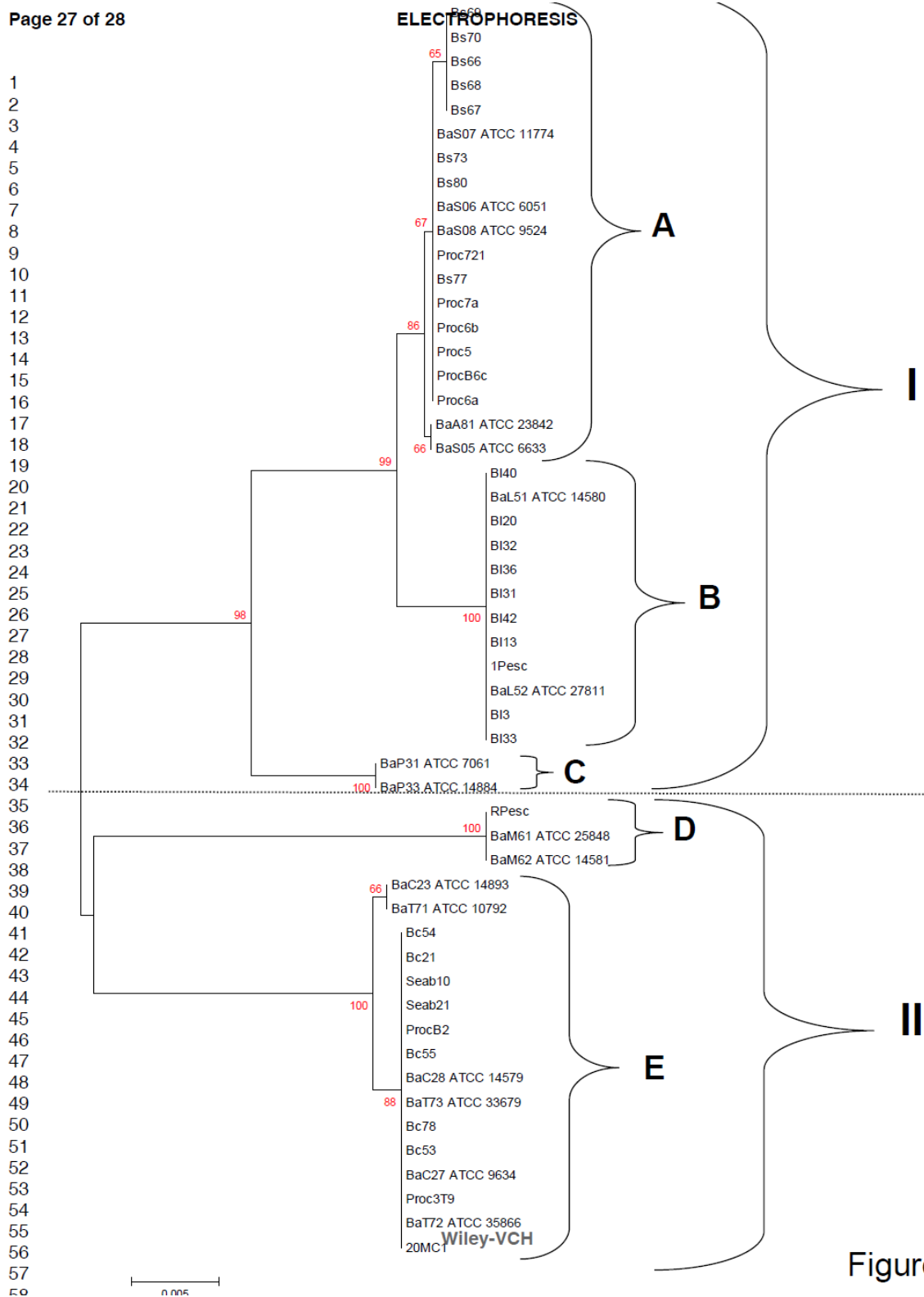


Figure 1

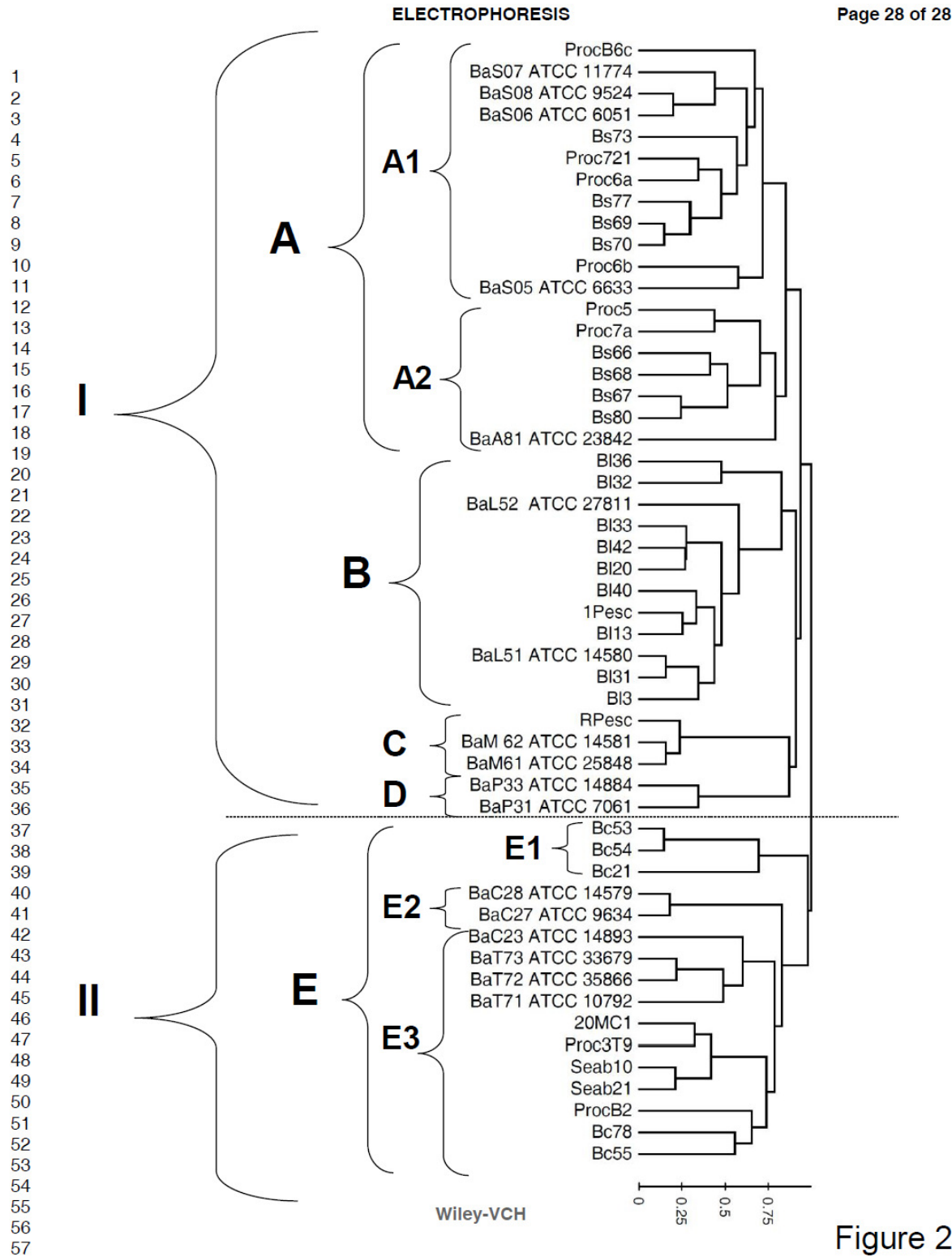


Figure 2

Bs66	agtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcttaatacatgcaagtcgagcggacagat-gggagcttgct
Bs69
BaA81_ATCC_23842C.....
Bs70
Rpesct.....C.....a.t...ta.a...
Bs80
BaC23_ATCC_14893t.....C.....a.tg...t.a...
BaT71_ATCC_10792t.....C.....a.tg...t.a...
BaM61_ATCC_25848t.....C.....a.t...ta.a...
Bs67
BaS06_ATCC_6051C.....
Bs68
ProcB6cC.....
Proc5C.....
Proc7aC.....
Proc6aC.....
BaS07_ATCC_11774C.....
BaS08_ATCC_9524C.....
BaS05_ATCC_6633C.....
Bl20C.....C.C...
BaL52_ATCC_27811C.....C..y...
Bl32C.....C.C...
lPescC.....C..y...
Bl31C.....C..y...
Bl13C.....C.C...
Bl3C.....C.C...
Bl36C.....C.C...
Bl40C.....C.C...
BaL51_ATCC_14580C.....C.C...
Bl33C.....C..y...
Bl42C.....C..y...
Proc721C.....
ProcB2t.....C.....a.tg...taa...
BaP31_ATCC_7061C.....a...
Bc54t.....C.....a.tg...taa...
Seab21t.....C.....a.tg...taa...
Bc78t.....C.....a.tg...taa...
Seab10t.....C.....a.tg...taa...
Bc53t.....C.....a.tg...taa...
BaP33_ATCC_14884C.....a...
Bc55t.....C.....a.tg...taa...
BaT72_ATCC_35866t.....C.....a.tg...taa...
BaC28_ATCC_14579t.....C.....a.tg...taa...
Proc3T9t.....C.....a.tg...taa...
20MC1t.....C.....a.tg...taa...
Bc21t.....C.....a.tg...taa...
BaC27_ATCC_9634t.....C.....a.tg...taa...
BaT73_ATCC_33679t.....C.....a.tg...taa...
BaM62_ATCC_14581t.....C.....a.t...ta.a...
Bs73C.....
Bs77C.....
Proc6bC.....
Bs66	ccc-tgatgttagcggcggacgggtgagtaaacacgtgggtaacctgcctgtaagactgggataaactccgggaaacggg
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpesc	t.ta...c.....C.....t.....a
Bs80
BaC23_ATCC_14893	.t.aa..a.....ca.
BaT71_ATCC_10792	.t.aa..a.....ca.
BaM61_ATCC_25848	t.ta...c.....C.....t.....a
Bs67
BaS06_ATCC_6051C.....
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633
Bl20	...-t.g..c.....
BaL52_ATCC_27811	...-t.g..c.....
Bl32	...-t.g..c.....
lPesc	...-t.g..c.....
Bl31	...-t.g..c.....
Bl13	...-t.g..c.....
Bl3	...-t.g..c.....
Bl36	...-t.g..c.....
Bl40	...-t.g..c.....
BaL51_ATCC_14580	...-t.g..c.....
Bl33	...-t.g..c.....
Bl42	...-t.g..c.....
Proc721	...-g.....
ProcB2	...tta...a.....ca.
BaP31_ATCC_7061	...-g.....
Bc54	...tta...a.....ca.
Seab21	...tta...a.....ca.
Bc78	...tta...a.....ca.
Seab10	...tta...a.....ca.
Bc53	...tta...a.....ca.
BaP33_ATCC_14884	...-g.....
Bc55	...tta...a.....ca.
BaT72_ATCC_35866	...tta...a.....ca.
BaC28_ATCC_14579	...tta...a.....ca.
Proc3T9	...tta...a.....ca.
20MC1	...tta...a.....ca.
Bc21	...tta...a.....ca.
BaC27_ATCC_9634	...tta...a.....ca.
BaT73_ATCC_33679	...tta...a.....y...ca.
BaM62_ATCC_14581	t.ta...c.....c.....t.....a
Bs73	...-t.g..c.....
Bs77
Proc6b

Resultados

```

Bs66      ggctaataaccggatggttgtttgaaccgcgatggttcagacataaaagggtggctt-cggctaccacttacagatggacc
Bs69      .....c.....r.....-
BaA81_ATCC_23842 .....c.....r.....-
Bs70      .....c.....r.....-
Rpesc     a.....a.gatc.ctc.tt.....gag.tgat.g...a..t.....t.....g..-
Bs80      .....aayat.....t.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaC23_ATCC_14893 .....aayat.....t.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaT71_ATCC_10792 .....a.gatc.ctc.tt.....gag.tgat.g...a..t.....t.....g..-
BaM61_ATCC_25848a .....a.gatc.ctc.tt.....gag.tgat.g...a..t.....t.....g..-
Bs67      .....a.....-
BaS06_ATCC_6051 .....a.....-
Bs68      .....a.....-
ProcB6c   .....a.....-
Proc5     .....a.....-
Proc7a    .....y.....-
Proc6a    .....a.....-
BaS07_ATCC_11774 .....a.....-
BaS08_ATCC_9524 .....a.....-
BaS05_ATCC_6633 .....c.....-
B120      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
BaL52_ATCC_27811 .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B132      .....c..w.....aw.....tm.....-
lPesc     .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B131      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B113      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B13       .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B136      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B140      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
BaL51_ATCC_14580 .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B133      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
B142      .....c..a.....at.....t..a.....r.....-
Proc721   .....a.....-
ProcB2    .....aayat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaP31_ATCC_7061 a.....a...cc.....agg.g...ac.t.....gt.....-
Bc54      .....aayat.....t.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Seab21    .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Bc78      .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Seab10    .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Bc53      .....aayat.....t.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaP33_ATCC_14884 a.....a...cc.....agg.g...ac.t.....gt.....r.....-
Bc55      .....aayat.....t.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaT72_ATCC_35866 .....aacat.....y.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaC28_ATCC_14579 .....aacat.....y.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Proc3T9   .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
20MC1     .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
Bc21      .....aacat.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaC27_ATCC_9634 .....aayat.....yr.....ra.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaT73_ATCC_33679 .....aayat.....y.....ga.at.g...c.....gt.....tg.....-
BaM62_ATCC_14581 a.....a.gatc.ctc.tt.....gag.tgat.g...a..t.....t.....g..-
Bs73      .....a.....-
Bs77      .....a.....-
Proc6b    .....a.....-

Bs66      cgcggcgcattagctagttggtgaggttaacggctcaccaaggcracgatgcgtagccgacctgagaggggatcgcc
Bs69      .....g.....-
BaA81_ATCC_23842 .....g.....-
Bs70      .....t.....m.....a.....-
Rpesc     .....t.....a.....-
Bs80      .....t.....a.....-
BaC23_ATCC_14893 .....t.....a.....-
BaT71_ATCC_10792 .....t.....a.....-
BaM61_ATCC_25848 .....t.....a.....-
Bs67      .....a.....-
BaS06_ATCC_6051 .....a.....-
Bs68      .....a.....-
ProcB6c   .....a.....-
Proc5     .....g.....-
Proc7a    .....g.....-
Proc6a    .....g.....-
BaS07_ATCC_11774 .....y.....a.....-
BaS08_ATCC_9524 .....y.....a.....-
BaS05_ATCC_6633 .....t.....-
B120      .....g.....-
BaL52_ATCC_27811 .....g.....-
B132      .....r.....g.....-
lPesc     .....r.....g.....-
B131      .....g.....-
B113      .....g.....-
B13       .....g.....-
B136      .....g.....-
B140      .....r.....g.....-
BaL51_ATCC_14580 .....g.....-
B133      .....g.....-
B142      .....g.....-
Proc721   .....t.....-
ProcB2    .....g.....-
BaP31_ATCC_7061 .....t.....g.....t.....a.....-
Bc54      .....t.....a.....-
Seab21    .....t.....a.....-
Bc78      .....t.....a.....-
Seab10    .....t.....a.....-
Bc53      .....t.....a.....-
BaP33_ATCC_14884 .....t.....g.....t.....g.....-
Bc55      .....t.....a.....-
BaT72_ATCC_35866 .....t.....a.....-
BaC28_ATCC_14579 .....t.....a.....-
Proc3T9   .....t.....a.....-
20MC1     .....t.....a.....-
Bc21      .....t.....a.....-
BaC27_ATCC_9634 .....t.....a.....-
BaT73_ATCC_33679 .....t.....a.....-
BaM62_ATCC_14581 .....t.....a.....a.....-
Bs73      .....a.....-
Bs77      .....a.....-
Proc6b    .....a.....-

```


Bs66	acactgggactgagacacgggccagactcctacggggaggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgac
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpesc
Bs80
BaC23_ATCC_14893
BaT71_ATCC_10792
BaM61_ATCC_25848
Bs67
BaS06_ATCC_6051
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633
B120
BaL52_ATCC_27811
B132
lPesc
B131
B113
B13
B136
B140
BaL51_ATCC_14580
B133
B142
Proc721
ProcB2
BaP31_ATCC_7061
Bc54
Seab21
Bc78
Seab10
Bc53
BaP33_ATCC_14884
Bc55
BaT72_ATCC_35866
BaC28_ATCC_14579
Proc3T9
20MC1
Bc21
BaC27_ATCC_9634
BaT73_ATCC_33679
BaM62_ATCC_14581
Bs73
Bs77
Proc6b
Bs66	ggagcaacgcgcgtgagtgatgaagggttttcggatcgtaaaagctctgttgtagggaagaacaagtgccgttcaaat
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
RpescC.....g.....a.....a.aagagt..c
Bs80
BaC23_ATCC_14893C.....g.....a.....tag.tg..
BaT71_ATCC_10792C.....g.....a.....tag.tr..
BaM61_ATCC_25848C.....g.....a.....a.ragagt..c
Bs67
BaS06_ATCC_6051a.....g...
Bs68
ProcB6ca.....g...
Proc5
Proc7a
Proc6aa.....g...
BaS07_ATCC_11774a.....g...Y
BaS08_ATCC_9524r.....g...Y
BaS05_ATCC_6633a.....g...
B120a.....g...
BaL52_ATCC_27811a.....g...
B132a.....g...Y
lPesca.....g...
B131a.....g...
B113a.....g...
B13a.....g...
B136a.....g...c
B140a.....g...
BaL51_ATCC_14580a.....g...
B133a.....g...
B142a.....g...
Proc721a.....g...
ProcB2C.....g.....a.....tag.tg...
BaP31_ATCC_7061gagagt..c
Bc54C.....g.....a.....tag.tg...
Seab21C.....g.....a.....tag.tg...
Bc78C.....g.....a.....tag.tg...
Seab10C.....g.....a.....tag.tg...
Bc53C.....g.....a.....tag.tg...
BaP33_ATCC_14884gagagt..c
Bc55C.....g.....a.....tag.tg...
BaT72_ATCC_35866C.....g.....a.....tag.tg...
BaC28_ATCC_14579C.....g.....a.....tag.tg...
Proc3T9C.....g.....a.....tag.tg...
20MC1C.....g.....a.....tag.tg...
Bc21C.....g.....a.....tag.tg...
BaC27_ATCC_9634C.....g.....a.....tag.tg...
BaT73_ATCC_33679C.....g.....a.....tag.tg...
BaM62_ATCC_14581C.....g.....a.....a.ragagt..c
Bs73a.....g...
Bs77a.....g...
Proc6ba.....g...

Resultados

Bs66	agggcgccaccttgacgggtacctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggc
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpesc	t.ctt.-t.....
Bs80
BaC23_ATCC_14893	.a.ct.....
BaT71_ATCC_10792	.a.ct.....
BaM61_ATCC_25848	t.cty.-t.....
Bs67
BaS06_ATCC_6051t.....
Bs68
ProcB6ct.....
Proc5
Proc7a
Proc6atr.....
BaS07_ATCC_11774t.....
BaS08_ATCC_9524t.....
BaS05_ATCC_6633t.....
B120y.....
BaL52_ATCC_27811t.....
B132y.....
1Pescy.....
B131y.....
B113y.....
B13y.....
B136t.....
B140y.....
BaL51_ATCC_14580y.....
B133y.....
B142y.....
Proc721tr.....
ProcB2	.a.ct.....
BaP31_ATCC_7061	t.ct.-.....
Bc54	.a.ct.....
Seab21	.a.ct.....
Bc78	.a.ct.....
Seab10	.a.ct.....
Bc53	.a.ct.....
BaP33_ATCC_14884t	.ct.-.....
Bc55	.a.ct.....
BaT72_ATCC_35866	.a.ct.....
BaC28_ATCC_14579	.a.ct.....
Proc3T9	.a.ct.....
20MC1	.a.ct.....
Bc21	.a.ct.....
BaC27_ATCC_9634	.a.ct.....
BaT73_ATCC_33679	.a.ct.....
BaM62_ATCC_14581	t.cty.-t.....
Bs73t.....
Bs77t.....
Proc6bt.....
Bs66	aagcggttgccggaattattggcgtaaaagggtcgcaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagcccccggtcaac
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
RPesca.....c.g.....a.....
Bs80
BaC23_ATCC_14893a.....c.g.....t.....a.....
BaT71_ATCC_10792a.....c.g.....t.....a.....
BaM61_ATCC_25848a.....c.g.....t.....a.....
Bs67
BaS06_ATCC_6051
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774a.ct.....
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633c.....
B120c.g.....
BaL52_ATCC_27811c.g.....
B132c.g.....yy.....
1Pescc.g.....
B131c.g.....
B113c.g.....
B13c.g.....
B136c.g.....ct.....
B140c.g.....
BaL51_ATCC_14580c.g.....
B133c.g.....
B142c.g.....
Proc721
ProcB2a.....c.g.....t.....a.....
BaP31_ATCC_7061
Bc54a.....c.g.....t.....a.....
Seab21a.....c.g.....t.....a.....
Bc78a.....c.g.....t.....a.....
Seab10a.....c.g.....t.....a.....
Bc53a.....c.g.....t.....a.....
BaP33_ATCC_14884
Bc55a.....c.g.....t.....a.....
BaT72_ATCC_35866a.....c.g.....t.....a.....
BaC28_ATCC_14579a.....c.g.....t.....a.....
Proc3T9a.....c.g.....t.....a.....
20MC1a.....c.g.....t.....a.....
Bc21a.....c.g.....t.....a.....
BaC27_ATCC_9634a.....c.g.....t.....a.....
BaT73_ATCC_33679a.....c.g.....t.....a.....
BaM62_ATCC_14581a.....c.g.....t.....a.....
Bs73
Bs77
Proc6b

Bs66	cggggaggggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaagaggagagtggaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgt
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpesc	..t.....a.a..c.....
Bs80
BaC23_ATCC_14893	..t.....ag.....a.....t.....
BaT71_ATCC_10792	..t.....ag.....a.....t.....
BaM61_ATCC_25848	..t.....ag.....a.a..c.....t.....
Bs67
BaS06_ATCC_6051
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633
Bl20
BaL52_ATCC_27811
Bl32
lPesc
Bl31
Bl13
Bl3
Bl36
Bl40
BaL51_ATCC_14580
Bl33
Bl42
Proc721
ProcB2	..t.....ag.....a.....t.....
BaP31_ATCC_7061a.....
Bc54	..t.....ag.....a.....t.....
Seab21	..t.....ag.....a.....t.....
Bc78	..t.....ag.....a.....t.....
Seab10	..t.....ag.....a.....t.....
Bc53	..t.....ag.....a.....t.....
BaP33_ATCC_14884a.....
Bc55	..t.....ag.....a.....t.....
BaT72_ATCC_35866	..t.....ag.....a.....t.....
BaC28_ATCC_14579	..t.....ag.....a.....t.....
Proc3T9	..t.....ag.....a.....t.....
20MC1	..t.....ag.....a.....t.....
Bc21	..t.....ag.....a.....t.....
BaC27_ATCC_9634	..t.....ag.....a.....t.....
BaT73_ATCC_33679	..t.....ag.....a.....t.....
BaM62_ATCC_14581	..t.....a.a..c.....t.....
Bs73
Bs77
Proc6bf.....
Bs66	agagatgtggaggaacaccagtggcgaaggcgactctctggtctgttaactgacgctgaggagcgaaagcgtggggagc
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpescg..t.t.....c.....
Bs80
BaC23_ATCC_14893a.....t.....a.....c.....
BaT71_ATCC_10792a.....t.....a.....c.....
BaM61_ATCC_25848a.....g..t.t.....a.....c.....
Bs67
BaS06_ATCC_6051
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633
Bl20c.....
BaL52_ATCC_27811c.....
Bl32c.....
lPescc.....
Bl31c.....
Bl13c.....
Bl3c.....
Bl36c.....
Bl40c.....
BaL51_ATCC_14580c.....
Bl33c.....
Bl42c.....
Proc721
ProcB2a.....t.....a.....c.....
BaP31_ATCC_7061
Bc54a.....t.....a.....c.....
Seab21a.....t.....a.....c.....
Bc78a.....t.....a.....c.....
Seab10a.....t.....a.....c.....
Bc53a.....t.....a.....c.....
BaP33_ATCC_14884
Bc55a.....t.....a.....c.....
BaT72_ATCC_35866a.....t.....a.....c.....
BaC28_ATCC_14579a.....t.....a.....c.....
Proc3T9a.....t.....a.....c.....
20MC1a.....t.....a.....c.....
Bc21a.....t.....a.....c.....
BaC27_ATCC_9634a.....t.....a.....c.....
BaT73_ATCC_33679a.....t.....a.....c.....
BaM62_ATCC_14581g..t.t.....c.....
Bs73
Bs77
Proc6b

Bs66	gaacaggattagataccctggtagtc c
Bs69
BaA81_ATCC_23842
Bs70
Rpesc	a.....
Bs80
BaC23_ATCC_14893	a.....
BaT71_ATCC_10792	a.....
BaM61_ATCC_25848	a.....
Bs67
BaS06_ATCC_6051
Bs68
ProcB6c
Proc5
Proc7a
Proc6a
BaS07_ATCC_11774
BaS08_ATCC_9524
BaS05_ATCC_6633
B120
BaL52_ATCC_27811
B132
1Pesc
B131
B113
B13
B136
B140
BaL51_ATCC_14580
B133
B142
Proc721
ProcB2	a.....
BaP31_ATCC_7061
Bc54	a.....
Seab21	a.....
Bc78	a.....
Seab10	a.....
Bc53	a.....
BaP33_ATCC_14884
Bc55	a.....
BaT72_ATCC_35866	a.....
BaC28_ATCC_14579	a.....
Proc3T9	a.....
20MC1	a.....
Bc21	a.....
BaC27_ATCC_9634	a.....
BaT73_ATCC_33679	a.....
BaM62_ATCC_14581	a.....
Bs73
Bs77
Proc6b

FIGURE 1S

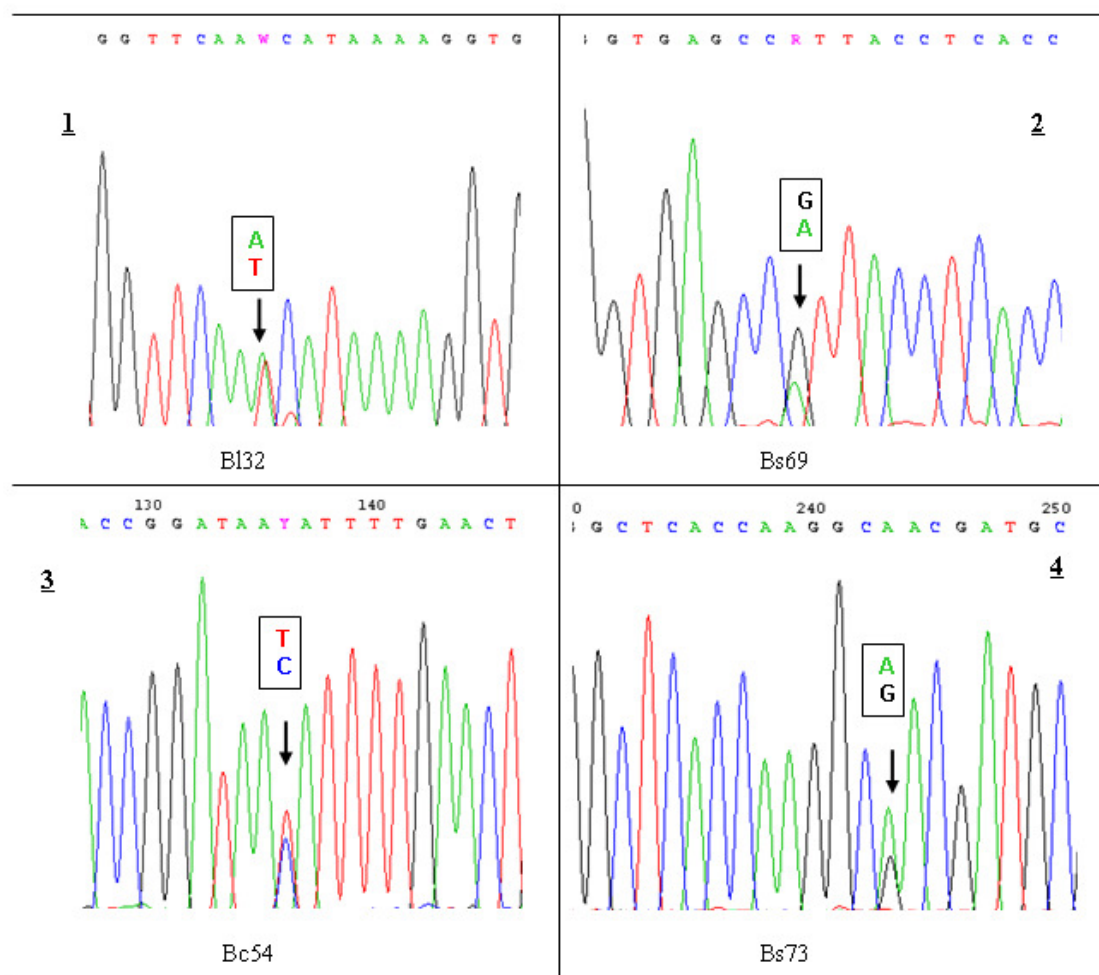


FIGURE 2S

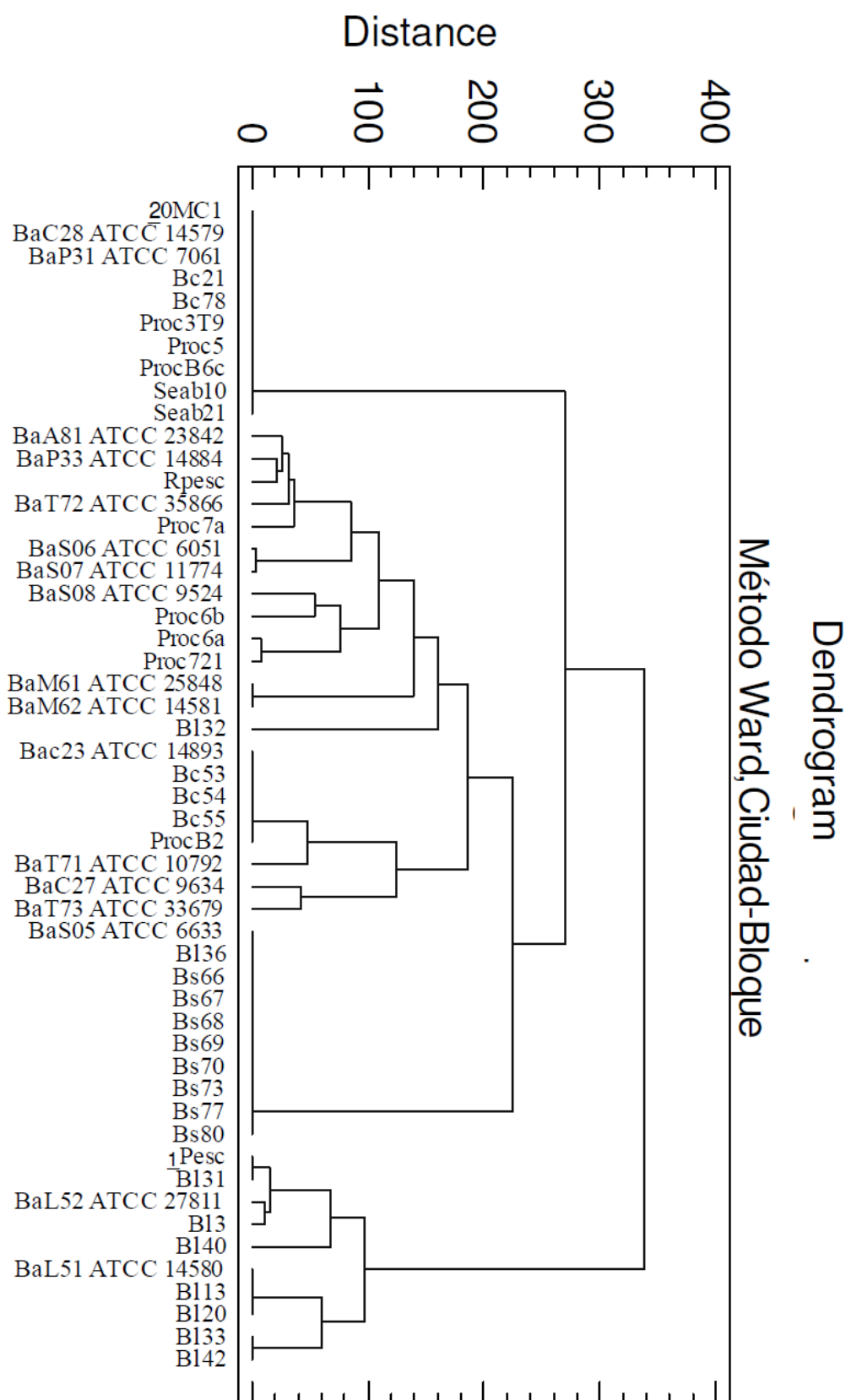


FIGURE 3S

BACTERIAL SPECIE	STRAIN	16S	ITS	23S	5S	tRNA
<i>Bacillus cereus</i>	AH187	14	14	14	14	103
<i>Bacillus cereus</i>	AH820	12	12	12	12	95
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10987	12	12	12	12	97
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	13	13	13	13	108
<i>Bacillus cereus</i>	B4264	14	14	14	14	107
<i>Bacillus cereus</i>	BGSC 6A1	13	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus cereus</i>	E33L	13	13	13	13	96
<i>Bacillus cereus</i>	G9842	13	13	13	13	96
<i>Bacillus cereus</i>	NVH391-98	13	13	13	13	106
<i>Bacillus cereus</i>	Q1	13	13	13	13	94
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580 (DSM 13) (Gottingen)	7	7	7	7	72
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580 (Novozymes)	7	7	7	7	72
<i>Bacillus pumilus</i>	SAFR-032	7	7	7	7	69
<i>Bacillus subtilis</i>	168	10	10	10	10	87
<i>Bacillus thuringiensis</i>	4Q2-81 (BGSC 4Q7)	13	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	97-27	14	13	13	14	105
<i>Bacillus thuringiensis</i>	al Hakam	14	14	14	14	104
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 35646	13	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	HD1 (BGSC 4D1)	13	NA	NA	NA	NA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	HD224 (BGSC 4H2)	13	NA	NA	NA	NA

NA:Not analyzed

Table 1S. Information on the number of operons of different species of *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* obtained from the rrndb database.

4.DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de bacterias productoras de histamina aisladas de besugo (*Pagellus bogaraveo*) y rodaballo (*Psetta maxima*) de acuicultura

La histamina se forma por la descarboxilación de la histidina libre presente en el pescado, debido a la acción de las bacterias que poseen el gen que codifica para la enzima histidín descarboxilasa. La histamina es una amina biógena con un potencial altamente tóxico, produciendo una intoxicación conocida como “intoxicación histamínica”. La gravedad de los síntomas que produce en el consumidor está en función de la cantidad de histamina ingerida (Taylor, 1986). Una vez que la enzima histidín descarboxilasa se libera al medio extracelular puede estar activa en condiciones de refrigeración o incluso después de la descongelación, aunque las células bacterianas hubieran sido inactivadas previamente por congelación (Ben-Gigirey y col., 1998). Por otra parte, una vez que la histamina se forma, no puede ser eliminada por ningún tratamiento tecnológico del alimento, incluyendo la esterilización (Pan y James, 1985). Por lo tanto, es importante detectar e identificar las bacterias productoras de histamina en las especies de peces comerciales que contienen niveles significativos de histidina libre, como herramienta para prevenir la formación y acumulación de histamina.

En este estudio, dos de las principales especies bacterianas productoras de histamina fueron aisladas de rodaballo y besugo de acuicultura. Aunque ambas especies de peces contienen concentraciones moderadas de histidina, aproximadamente el 0,35%, en sus tejidos musculares (NIFES, 2011), no hay información que los relacione con sucesos de intoxicación histamínica. Por otra parte, ambas especies acuícolas han adquirido últimamente gran atención debido a su alto valor comercial, lo que subraya la necesidad de

controlar los potenciales riesgos microbiológicos y por la tanto de seguridad alimentaria que puedan exhibir.

Un estudio anterior (Alvarez y col., 2009) consideró herramientas moleculares para identificar presuntas bacterias productoras de histamina en besugo, pero dicho estudio fue preliminar, no confirmándose la producción de histamina no fue confirmada por HPLC. Por el contrario, en el presente estudio, la formación de histamina por parte de las dos cepas bacterianas aisladas de besugo y de rodaballo fue confirmada por HPLC. Esta técnica permitió descartar los falsos positivos producidos en el medio de detección de Niven, permitiendo la selección de las verdaderas bacterias productoras de histamina. Sorprendentemente, sólo 2 cepas de los 24 aislados seleccionados como positivos en el medio de Niven fueron confirmadas como verdaderas productoras de histamina. Ambas bacterias productoras de histamina pertenecían al género *Pseudomonas*, siendo este un grupo de microorganismos que a menudo está presente tanto en el pescado como en otros alimentos frescos, siendo causante de su deterioro. Así, estos microorganismos ya han sido propuestos como bacterias específicas del deterioro del pescado fresco refrigerado independiente del origen de los peces (Gram y Huss, 1996; Shewan y col., 1962). Aunque estudios previos han informado del aislamiento de bacterias productoras de histamina como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* a partir de otras especies de peces (Kim y col., 2003), en el presente trabajo se identificó por primera vez *P. fragi* y *P. syringae* como principales bacterias productoras de histamina presentes en rodaballo y besugo de acuicultura, respectivamente. *P. fragi* fue anteriormente descrita por producir olores desagradables en pescado, como consecuencia de los ésteres etílicos producidos durante el metabolismo de glucosa (Miller y col., 1973). Como consecuencia de la falta de glucosa, dicha especie inicia la acción bacteriana sobre los aminoácidos de pescado

(Daalgard, 2006).

La producción de histamina por ambas cepas fue moderada, alcanzando niveles superiores a 170 ppm y 270 ppm para *P. syringae* y *P. fragi*, respectivamente. Cabe destacar que *P. syringae* produjo más histamina que una de las principales bacterias productoras de histamina, *E. aerogenes* ATCC 13048. Ambas cepas mostraron un fenotipo proteolítico, confirmando así su posible actividad en el músculo de pescado *post mortem*, originando la degradación microbiana de las proteínas de pescado para producir aminoácidos, que a su vez pueden servir como sustratos para la formación de aminas biógenas. Sin embargo, este estudio demostró que el rodaballo es muy resistente a la formación de histamina, incluso después de su inoculación artificial con la prolífica productora de histamina *M. morganii*. Por lo tanto, con la inoculación en músculo de rodaballo, ya sea con *P. fragi* o *M. morganii* en los niveles y temperaturas de refrigeración consideradas por otros autores (Emborg y col., 2005), se llegó a niveles de histamina por debajo de 30 ppm después de seis días de almacenamiento a 10 °C y cinco días a 4 °C. Aunque ya se ha publicado anteriormente que la formación de histamina es más intensa con temperaturas de almacenamiento más altas (Kim y col., 2000), con los datos recogidos en este estudio se puede concluir que la presencia de bacterias productoras de histamina en rodaballo no representa un riesgo importante de intoxicación por histamina. Por el contrario, con la inoculación en músculo de besugo de *P. syringae* o *M. morganii*, se llegó a concentraciones de histamina de 696 y 760 ppm., respectivamente. Aunque estas concentraciones pueden considerarse moderadamente altas, hay que destacar que éstas se han obtenido a temperaturas de 10 °C y 4 °C. Por lo tanto, estas concentraciones podrían aumentar a temperaturas superiores a las consideradas en este estudio, pues la concentración de histamina aumenta a medida que las temperaturas de conservación son

más altas (Kim y col., 2000). Este estudio también demostró que la formación de histamina en el besugo no se relaciona con enterobacterias, como a menudo se ha publicado para otras especies de peces (Ben-Gigirey y col., 1998; Kim y col., 2001; López Sabater y col., 1994).

Finalmente, se usó la técnica MALDI-TOF MS con el objetivo de lograr una identificación rápida y específica de las bacterias productoras de histamina. Ésta es una técnica rápida y sensible para diferenciar especies bacterianas (Giebel y col., 2010; Lay, 2001). Los perfiles espectrales obtenidos para *P. fragi* Turb47 y *P. syringae* Seab02, así como las listas de picos de masas obtenidas, permitieron diferenciar las dos especies con respecto a todas las demás bacterias alterantes y patógenas relevantes potencialmente presentes en productos marinos. Además, seis picos fueron identificados como específicos a nivel de especie en los rangos de masas 2534-7183 m/z y 2536-9113 m/z para *P. fragi* y *P. syringae*, respectivamente. La especificidad de estos picos destaca su importancia como biomarcadores en análisis de identificación. Los resultados del análisis proteómico confirmaron la clasificación de las cepas Turb47 y Seab02 como *P. fragi* y *P. syringae*, respectivamente, lo que confirma los resultados del análisis filogenético.

En resumen, este estudio describe por primera vez el aislamiento de *P. syringae* y *P. fragi* como especies productoras de histamina presentes en rodaballo y besugo de piscifactoría, respectivamente. Mientras que el rodaballo no representa un riesgo significativo, en el besugo se acumularon cantidades moderadamente altas de histamina en condiciones de refrigeración por debajo de 10 °C, un resultado que pone de relieve su riesgo potencial para la acumulación de aminas biógenas si no se respetan las condiciones de higiene y refrigeración.. Por último, el análisis MALDI-TOF MS permitió obtener listas de masas específicas que permiten la identificación rápida de estos microorganismos tanto

en pescado como en otros productos alimenticios.

4.2. Caracterización diferencial de bacterias productoras de aminas biógenas relacionadas con intoxicaciones histamínicas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

La intoxicación histamínica representa un importante riesgo para la salud de los consumidores y está relacionada con el consumo de alimentos en los que han proliferado bacterias productoras de aminas biógenas. El consumo de altos niveles de histamina puede dar lugar a náuseas, alteraciones respiratorias, dolores de cabeza, hiper- o hipotensión, etc. Sin embargo, no es únicamente la histamina el agente causante de tal intoxicación (Hwi-Chang y col., 2008). Se cree que la presencia de otras aminas biógenas como putrescina y cadaverina, las cuáles no son consideradas tóxicas a nivel individual, pueden estimular los efectos tóxicos de la histamina. Ciertos escómbridos, como el atún, la caballa o el bonito, contienen altos niveles de histidina libre en músculo y por lo tanto están a menudo implicados en este tipo de intoxicación. Sin embargo, diversas especies de peces no escómbridos así como otros alimentos, también han estado relacionados con casos de envenenamiento por histamina (Hwi-Chang y col., 2008).

Un número significativo de especies bacterianas posee la enzima histidín descarboxilasa y por lo tanto tienen la capacidad de producir histamina. Entre ellas, las especies estudiadas en este trabajo representan las principales productoras de histamina en pescado, mariscos, quesos y otros productos alimentarios descritos en la literatura científica hasta la fecha. Por esta razón, la presencia de estas especies bacterianas en los alimentos conlleva un riesgo de formación y acumulación de histamina, pudiendo llegar a niveles tóxicos y por lo tanto convirtiendo al alimento en perjudicial para la salud del consumidor. Así, con el fin de prevenir el envenenamiento por histamina y para garantizar

la seguridad alimentaria en el pescado y otros productos alimentarios, es importante detectar e identificar de una manera rápida y específica las especies bacterianas responsables de la formación y consiguiente acumulación de histamina.

Muchos trabajos se han centrado en la determinación de los niveles de histamina y la identificación de las bacterias productoras en alimentos, para ello se han considerado métodos microbiológicos, bioquímicos, enzimáticos, cromatográficos y genéticos. Entre los métodos microbiológicos y genéticos destinados a la detección precoz de las bacterias productoras de histamina en los alimentos, el medio de Niven ha sido ampliamente utilizado para su aislamiento (Niven, 1981; Yoshinaga y Frank, 1982). Aunque es un buen método para un cribado inicial, puede dar lugar a falsos positivos y requiere confirmación por HPLC. Por otro lado, recientemente se han introducido técnicas genéticas como la hibridación dot-blot (Ben-Gigirey y col., 2002) y métodos basados en la detección del gen 16S rRNA (Kim y col., 2003) o del gen de la histidín descarboxilasa (Marcobal y col., 2006) mediante PCR. La PCR en tiempo real ha complementado a la PCR convencional, permitiendo cuantificar las bacterias productoras de histamina en el pescado, contribuyendo de este modo a la detección precoz de la intoxicación por histamina (Fernández y col., 2006). Sin embargo, un inconveniente de estas técnicas genéticas es que requieren el conocimiento o sospecha previa de la presencia de dichas bacterias en el alimento para permitir su detección. Además, los métodos basados en PCR tienen el inconveniente que la ADN polimerasa puede ser inhibida por los componentes de ciertos alimentos o ciertos aditivos, lo que puede conducir a la obtención de falsos negativos.

Por todo lo anteriormente expuesto, en el presente estudio hemos aplicado una herramienta molecular rápida y sensible, la espectrometría de masas MALDI-TOF, para lograr la identificación rápida y específica de las principales bacterias productoras de

histamina aisladas de alimentos. Las metodologías basadas en el análisis de proteínas representan una alternativa complementaria a los métodos genómicos, ya que reducen el tiempo de análisis, tienen un bajo coste y también muestran una alta precisión y sensibilidad. Por estas razones, diversos autores han descrito la utilidad de los perfiles de proteínas obtenidos por MALDI-TOF MS para la identificación de especies bacterianas, principalmente patógenos humanos (Ruelle y col., 2004). La técnica de MALDI-TOF-MS representa una técnica rápida debido a que requiere una preparación simple de la muestra, permitiendo incluso llevar a cabo el análisis de la célula bacteriana entera (Smole y col., 2002; Erhard y col., 2008). Así, otros autores han descrito la utilidad del MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias patógenas y no patógenas en alimentos (Erhard y col., 2008). Asimismo, otros autores han proporcionado espectros de *Listeria* spp. que resultaron mostrar picos característicos, conservados tanto a nivel de especies como de género, y que permiten su identificación rápida en alimentos (Sukhadeo y col., 2008).

El presente estudio ha prestado especial atención a la reproducibilidad de los picos de masas seleccionados como representativos de cada una de las principales bacterias productoras de histamina. Para ello, cada cepa bacteriana considerada en este trabajo se cultivó por duplicado y cada una de las replicas se analizó por MALDI-TOF-MS también por duplicado. Esta estrategia tenía como objetivo comprobar la reproducibilidad del crecimiento bacteriano y la preparación de muestras. En consecuencia, se obtuvieron cuatro espectros para cada cepa bacteriana productora de aminas biógenas. Un análisis cuidadoso de los cuatro espectros obtenidos para cada cepa bacteriana permitió la selección de los picos cuyas masas estaban presentes en los cuatro espectros obtenidos. De esta forma se garantiza que los picos seleccionados sean característicos de cada cepa bacteriana. Por otro lado, las medias aritméticas para los valores de m/z se calcularon para

cada conjunto de cuatro espectros, resultando en variaciones de masa inferiores a ± 5 Da en el rango de masa superior a 7.000 Da e inferiores a ± 3 Da en los rangos de masa menores a 7000 Da. Estos resultados destacaron la fiabilidad y reproducibilidad de los protocolos de cultivo de las cepas, extracción y análisis de MS.

En este sentido, estudios previos han discutido la influencia de diversos parámetros, tales como las condiciones de cultivo bacteriano, la fase de crecimiento o el protocolo de preparación de muestras sobre la reproducibilidad de los perfiles de MALDI-TOF-MS. Mientras que la metodología de preparación de la muestra es especialmente relevante a la hora de obtener espectros de masas reproducibles y comparables por análisis MALDI-TOF-MS (Mazzeo, 2006), la naturaleza del medio de cultivo parece ejercer un menor efecto sobre la reproducibilidad de los espectros de masas. Para ello, en este trabajo se ha seguido un protocolo estandarizado y los espectros de masas obtenidos han sido reproducibles.

Aunque se han utilizado recientemente herramientas proteómicas para la definición de biomarcadores microbianos, ya sea a nivel de género, de especie o incluso de cepa (Holland y col., 1999; Fagerquist y col., 2005) no se han utilizado todavía para proporcionar espectros que pueden contribuir a la identificación directa de bacterias productoras de histamina de importancia en seguridad alimentaria. En consecuencia, en este estudio hemos considerado las especies microbianas más relevantes involucradas en el envenenamiento por histamina de acuerdo con la literatura científica. Así, se obtuvieron las listas de masas de los picos característicos que sirven de referencia a nivel de género y especie, consiguiendo así distinguir las especies analizadas de forma inequívoca. La aplicación de la aplicación Web SPECLUST permitió la agrupación de las listas de masas y la construcción de un árbol filoproteómico utilizando los picos característicos de cada

una de las cepas bacterianas. El dendograma obtenido mostró una buena correlación con respecto al análisis filogenético, demostrando que la aplicación SPECLUST es una herramienta rápida y robusta para la comparación y discriminación de perfiles espectrales bacterianos.

En resumen, el presente estudio describe una la identificación rápida y específica de las principales bacterias aisladas de pescado y otros productos alimentarios responsables de la intoxicación histamínica. Los perfiles espectrales proporcionaron huellas altamente específicas que hicieron posible diferenciar todas las especies consideradas. La biblioteca de espectros de masas proporcionadas en este trabajo servirá como referencia para la identificación de los principales microorganismos responsables de la intoxicación histamínica y por lo tanto ayudará a prevenirla. Aún así, es conveniente seguir aumentando esta biblioteca con nuevas bacterias productoras de aminos biógenas.

4.3. Aislamiento y caracterización de *Streptococcus parauberis* aislado de un producto marino refrigerado y envasado al vacío

Hoy en día, la industria alimentaria está llevando a cabo grandes esfuerzos para lograr la seguridad microbiológica de los alimentos y, al mismo tiempo, extender su vida útil. En este sentido, la combinación del envasado al vacío junto con el almacenamiento en refrigeración se está utilizando ampliamente en la industria alimentaria debido a su eficacia en la reducción de las reacciones oxidativas y la inhibición de crecimiento microbiano (Flick y col., 1992). Sin embargo, esto no es suficiente para evitar por completo el crecimiento de bacterias patógenas o alterantes. Otros autores han publicado previamente el aislamiento de cepas alterantes pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Photobacterium* en salmón ahumado envasado al vacío y refrigerado (Olofsson y col.,

2007). Asimismo, cepas alterantes de *Pseudomonas* y *Shewanella* se han aislado de otros pescados y productos marinos refrigerados (Pantazi y col., 2008). A pesar de que el almacenamiento refrigerado a 5 °C mejora la estabilidad y la seguridad del envasado al vacío de los productos marinos, reduciendo el crecimiento de mesófilos (Chen, 1995), una amplia variedad de microorganismos, incluso cepas patógenas, se han aislado a partir de productos pesqueros refrigerados, debido a su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración. Entre ellos destacan *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* (Hudson y Mott, 1993).

Por las razones anteriormente expuestas, la rápida identificación de los microorganismos potencialmente relacionados con la pérdida de calidad y seguridad de productos marinos es de crucial importancia. Aunque *S. parauberis* tradicionalmente no ha estado ligado al deterioro de los alimentos, recientemente se identificó como responsable de la alteración de carne de pollo envasada en atmósfera modificada y de la planta de procesado (Koort y col., 2006). En otro trabajo reciente también se ha descrito el aislamiento de una cepa de *S. parauberis* a partir de jamón cocido pasteurizado y almacenado durante 2 días a 2 °C después de la pasteurización y antes del envasado, aunque esta cepa luego no pudo ser aislada en el producto final (Vasilopoulos y col., 2010). En los estudios citados anteriormente se ha descrito que esta especie es capaz de crecer a bajas temperaturas, incluso bajo condiciones de atmósfera modificada, utilizando como fuente de carbono carbohidratos como el almidón. El hecho de que el producto de nuestro estudio estuviese fabricado a base de surimi, que incluye almidón de trigo como ingrediente, puede explicar el crecimiento y deterioro de este producto por *S. parauberis*. En este sentido, nuestro estudio coincide con los resultados de publicaciones anteriores y proporciona evidencia adicional de la posible presencia y el crecimiento de *S. parauberis* en otros productos alimentarios que contienen hidratos de carbono complejos, tales como

productos elaborados a base de pescado e incluso envasados a vacío. Con respecto a la identificación de las cepas, los tres aislados de *S. parauberis* a partir de carne de pollo (Koort y col., 2006) poseían, al igual que en nuestro caso, alta similaridad con cepas de *S. parauberis*. Además los análisis fenotípicos, genotípicos y proteómicos considerados en nuestro estudio revelaron que los dos cepas de *S. parauberis* aisladas de producto de la pesca envasado a vacío y deteriorado eran idénticas.

El presente estudio también supone la aplicación por primera vez de una técnica molecular robusta como el análisis MALDI-TOF MS para obtener un perfil espectral característico de *S. parauberis* con el fin de obtener una rápida identificación bacteriana.

La técnica de MALDI-TOF MS ha demostrado ser una herramienta rápida y sensible para la diferenciación de especies bacterianas (Giebel y col., 2010; Lay, 2001). Por lo tanto, la comparación de los perfiles espectrales de cepas de bacterias desconocidas con una biblioteca de espectros de referencia permite la clasificación e identificación de las cepas de una manera rápida y precisa (Böhme y col., 2010a; Seng y col., 2009). Así, los perfiles de espectros de masas obtenidos para las cepas 83B y 83C de *S. parauberis* resultaron ser idénticos, lo que supone un perfil específico del espectro y una lista de picos de masas que pueden ser fácilmente diferenciados del resto de especies bacterianas presentes en la biblioteca de referencia. Además, la comparación con cepas de referencia tales como *S. parauberis* DSM6631 y *S. parauberis* DSM6632, permitió detectar cinco picos cuyas masas resultaron ser específicas para esta especie, pudiendo servir como biomarcadores específicos de *S. parauberis* en estudios futuros.

En resumen, este estudio supone el primer aislamiento de *S. parauberis* de productos marinos en general, y de productos refrigerados y envasados a vacío en particular, subrayando la idea de que esta especie probablemente se deba considerar en el

futuro en la investigación y el control de bacterias causantes del deterioro en este tipo de productos alimentarios. El análisis genético reveló la agrupación de los aislamientos de *S. parauberis* 83B y 83C con otras cepas de referencia de esta especie y en un grupo diferente con respecto a *S. uberis*. Por último, la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF permitió la identificación rápida y directa de *S. parauberis*, proporcionando espectros específicos que podrían utilizarse para distinguir fácilmente esta especie bacteriana con respecto a otras bacterias implicadas en el deterioro de productos marinos y de otros alimentos.

4.4. Detección y cuantificación de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* patógenos y alterantes de alimentos mediante PCR en tiempo real

La investigación de microorganismos capaces de comprometer la calidad y la seguridad de los alimentos es una preocupación tanto para la industria alimentaria como para la Administración. Entre estos microorganismos ciertos *Bacillus* spp., tales como *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* son de relevancia, debido a su carácter alterante y/o patógeno y debido también a que estas especies bacterianas son capaces de resistir ciertos métodos de conservación, tales como la pasteurización. El objetivo de este trabajo ha sido diseñar un conjunto de cebadores-sonda de RTi-PCR que permitan su cuantificación en alimentos.

Otros autores han descrito métodos convencionales de PCR para la detección de ciertas especies de *Bacillus*, aunque estos estudios no distinguen entre *B. cereus* y *Bacillus thuringiensis* (teGiffel y col., 1997). Del mismo modo, la PCR específica combinada con ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) también ha permitido la identificación, pero no la cuantificación de *Bacillus* spp. (Wu y col., 2006). La PCR convencional, a

diferencia de la RTi-PCR, no aporta ninguna información cuantitativa, requiriendo asimismo más tiempo pues es necesaria una visualización final de ADN por electroforesis. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha desarrollado un método de RTi-PCR para cuantificar específicamente las tres especies de *Bacillus* spp más relevantes que pueden estar presentes en los productos alimentarios.

En relación a la RTi-PCR, algunos autores han propuesto métodos que usan Sybr Green para detectar y cuantificar *Pseudomonas* en pescado (Reynisson y col., 2008) o *Corynebacterium casei* en queso (Monnet y col., 2006). Otros autores, en cambio, han utilizado sondas TaqMan para detectar y cuantificar otros microorganismos, como *Leuconostoc mesenteroides* en productos cárnicos (Elizaquivel y col., 2008). Recientemente se ha descrito la detección de *B. cereus* en gelatina contaminada. En dicho estudio se ha diseñado un set de primers y sonda pero con el objetivo de detectar únicamente *B. cereus* (Reekmans y col., 2009). Asimismo, recientemente se ha propuesto otro método para la detección y cuantificación de las cepas de *B. cereus* enterotoxigénicas en muestras de alimentos (Martínez-Blanch y col., 2009). A diferencia de todos estos métodos, el conjunto sonda-primer propuesto en nuestro estudio permite la detección y cuantificación de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* en un único ensayo.

Para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda TaqMan se compararon las secuencias del gen 16S ADNr pertenecientes a las cepas de *Bacillus* spp obtenidas en este estudio con secuencias de cepas de referencia recuperadas del GenBank. Se procedió a la selección de secuencias consenso presentes en las diversas cepas y especies consideradas, y ausentes en otras especies microbianas para evitar problemas de amplificación cruzada y los consiguientes falsos positivos. Los resultados indicaron que la amplificación de las *Bacillus* spp. consideradas tuvo lugar a valores de Ct entre 14 y 15, mientras que la

amplificación inespecífica de otras especies bacterianas tuvieron lugar a valores de Ct por encima de 28.5. Tanto la curva patrón construida a partir de cultivos puros como la construida a partir alimentos inoculados mostraron buena linealidad [$R^2 = 0.9969$ y $R^2 = 0.9958$, respectivamente, resultados que fueron similares a los obtenidos por Martínez-Blanch y col., 2009) con *B. cereus*], siendo los valores de las pendientes de -3.25 y -3.18 , respectivamente. Estos valores se aproximan al óptimo teórico de -3.32 (Higuchi y col., 1993), lo que confirma la idoneidad de este ensayo para la cuantificación de *Bacillus* spp.

La eficiencia del método fue próxima al 100% (103% y 106% para las curvas de cultivo puro y alimento inoculado respectivamente). Además, el método desarrollado mostró alta sensibilidad, presentando un límite de detección que en ambos casos fue de 16,5 UFC/ml (165 UFC/g) en el alimento original sin diluir. Cabe destacar que se han descrito límites de detección (40 UFC /ml) para *B. cereus* enterotoxigénico en muestras de alimentos, ligeramente más altos a los obtenidos en este estudio (Martínez-Blanch y col., 2009). Finalmente, el límite de cuantificación del método se correspondió con un valor medio de Ct de 27,41, debido al hecho de que este valor de Ct es inferior al valor de 28,5 que exhibieron las cepas no pertenecientes al género *Bacillus* spp.. Por todo lo anterior el método desarrollado es adecuado para detectar y cuantificar específicamente *B. cereus*, *B. licheniformis* o *B. subtilis* en alimentos, por lo que el método propuesto permitiría un control microbiológico de estas especies bacterianas esporoformadoras tanto en alimentos frescos como pasteurizados.

4.5. Caracterización de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* por espectrometría de masas MALDI-TOF

-Comparación de los métodos filogenético y filoproteómico para la identificación de Bacillus spp.

Los análisis filogenético y filoproteómico fueron capaces de agrupar las distintas *Bacillus* spp. estudiadas en dos grandes grupos (I y II). Sin embargo, se apreciaron algunas diferencias entre ambos análisis. Por una parte, el análisis filogenético proporciona una primera rama (I) que incluye el grupo *B. subtilis* (A), *B. licheniformis* (B) y *B. pumilus* (C) y una segunda rama (II), que incluye las cepas que pertenecen a *B. megaterium* (D) y el grupo de *B. cereus* (E). Por el contrario, el árbol filoproteómico agrupa las cepas de *B. megaterium* (C en la Figura 2) junto a *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* (grupos A, B y D, respectivamente, en la Figura 2). Es destacable que el análisis MALDI-TOF permite la separación de las cepas pertenecientes al grupo *B. cereus* (E en la Figura 2) con respecto a otros *Bacillus* spp. estudiados.

El análisis filogenético del gen 16S ADN_r no permitió diferenciar entre las especies que pertenecen al grupo *B. cereus* (*B. cereus* y *B. thuringiensis*, grupo E en la Figura 1) y tampoco entre las especies que pertenecen al grupo *B. subtilis* (*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, grupo A en la Figura 1). Nuestros resultados confirman los obtenidos en publicaciones anteriores sobre las dificultades para distinguir *B. cereus* de *B. thuringiensis* (Pavic y col., 2005; Chen y Tsen y col., 2002) y *B. subtilis* de *B. amyloliquefaciens* (Meer y col., 1991) debido a las similitudes en las secuencias nucleotídicas de los respectivos genes 16S ADN_r.

En cambio, el análisis MALDI-TOF sí permitió la diferenciación de las especies pertenecientes al grupo *B. subtilis* (*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) y al grupo *B. cereus*

(*B. cereus* y *B. thuringiensis*). Por lo tanto, los picos de masa específicos de especie recopilados en la Tabla 5 del capítulo 5 se pueden considerar biomarcadores útiles para la rápida identificación y clasificación de especies del género *Bacillus*, y un valioso complemento de dos estudios recientes (Lasch y col., 2009; Hotta y col., 2011). Los resultados del presente estudio confirman la utilidad del análisis MALDI-TOF MS para la identificación de cepas de *Bacillus* transmitidas por los alimentos, resultando ser más útil que la secuenciación del gen 16S ADNr a la hora de clasificar los grupos de *B. cereus* y *B. subtilis*, proporcionando asimismo una valiosa información a nivel intraespecífico.

-El análisis de SNPs en Bacillus spp.

El uso de SNPs en la caracterización microbiana tiene muchas ventajas debido a su naturaleza no ambigua y a la multitud de plataformas que se han desarrollado para el análisis de este tipo de marcadores. Los SNPs son evolutivamente estables (Pearson y col., 2004) y susceptibles a métodos de detección de alto rendimiento, tales como la PCR en tiempo real, la pirosecuenciación y la espectrometría de masas (Easterday y col., 2005). Se han descrito una amplia variedad de SNPs en bacterias patógenas, así como su papel en el aumento de la patogenicidad o patoadaptabilidad. Estas mutaciones son alteraciones genéticas en genes reguladores o estructurales que proporcionan una ventaja selectiva en el transcurso de una sola infección, propagación de la epidemia o la evolución a largo plazo de la virulencia (Sokurenko y col., 1999). Aunque muchas mutaciones patoadaptativas implican la pérdida de genes funcionales, los SNPs adaptativos por lo general resultan en una mínima alteración en la estructura de las proteínas codificadas. Es importante destacar que la presencia de SNPs como instrumento de adaptación a los cambios ambientales puede ser crítica para la supervivencia y la expansión de las poblaciones bacterianas (Kumar y col., 2008).

Por otra parte, los genes ribosomales han sido ampliamente utilizados como marcadores filogenéticos debido a su distribución universal, secuencia altamente conservada, estabilidad funcional, facilidad de secuenciación y características de sus estructuras primarias y secundarias con tramos de secuencias variables (Tourova, 2003). Los genes que codifican ARN ribosómico están organizados en varios operones ribosomales (rrn) en la mayoría de las bacterias. Por lo tanto, existen múltiples copias del gen ADNr que exhiben pequeñas diferencias dentro de cada genoma. Si bien el número de copias del operón ribosomal en el genoma bacteriano varía considerablemente de uno a 15, es relativamente constante en la especie, género e incluso a nivel de familia. La base de datos de ARN ribosomal (<http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/index.php>) recoge el número de genes ADNr en bacterias y *Archaea*. Otros autores han publicado la existencia de siete copias del gen 16S ADNr de *E. coli* (Qin y col., 2007). En el caso de *Bacillus*, se han encontrado hasta 14 operones de ARN ribosomal (Tabla 1S del capítulo 5).

Al comparar las secuencias de las cepas de nuestro estudio con las secuencias de los diferentes operones de la misma especie bacteriana depositadas en la base de datos de rrn, se puede comprobar la presencia de algunos SNPs tales como el SNP T>C (Y) en las posiciones 212 y 476 en *B. licheniformis* y el SNP A> G (R) en la posición 278 de *B. subtilis*, ya descritos anteriormente para estas. Por lo tanto, estos SNPs se encuentran con frecuencia en dichas especies y su presencia puede ser relevante para su identificación. Por otra parte, el presente trabajo describe, por primera vez, diferentes polimorfismos en el gen 16S ADNr de cepas de *Bacillus* spp. de referencia y silvestres, pudiendo representar asimismo una herramienta útil para la identificación de especies en este género.

Anteriormente otros autores han propuesto un método basado en cinco SNPs para clasificar *Streptococcus agalactiae* grupo B en diferentes subgrupos (Honsa y col., 2008). En dicho estudio se observaban diferencias entre las cepas pertenecientes a una misma

especie. En nuestro estudio también se han definido varios subgrupos sobre la base del análisis de los polimorfismos, aspecto que complementaría la información proporcionada por el análisis filogenético. Otros autores también han demostrado la utilidad de un pequeño grupo de SNPs en la definición de ciertos grupos genéticos. Así, Moorhead y col., (2003) utilizó un enfoque filogenético para identificar un pequeño número de SNPs de diagnóstico en el gen *sigB* de *Listeria Monocytogenes*. Del mismo modo, Keim y col., (2004) amplió este concepto y propuso la idea de un "SNP canónico" que se podría utilizar para identificar de manera eficiente un punto en la historia evolutiva de una especie.

En resumen, el presente estudio incluyó nuevas estrategias tales como el análisis de SNP y la espectrometría de masas en la identificación de especies de *Bacillus* spp. transmitidas por los alimentos. Se ha observado que la técnica MALDI-TOF puede ser más informativa en la diferenciación entre las especies, especialmente cuando el análisis genético no es concluyente, tales son los casos de la diferenciación de *B. subtilis* de *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus* de *B. thuringiensis*. Por otra parte, el análisis de SNP ha proporcionado información valiosa acerca de nuevos polimorfismos en el gen 16S ADNr de *Bacillus* spp. que deben ser considerados en el diseño de oligonucleótidos y sondas para técnicas avanzadas de diagnóstico como la multiplex-PCR, PCR en tiempo real y sistemas de microarrays.

5.CONCLUSIONES

5.1. Conclusión general:

Las técnicas genómicas y proteómicas son herramientas de vital importancia para la identificación rápida y específica de microorganismos patógenos y alterantes en productos de la pesca frescos y elaborados. En este trabajo se ha comprobado que las metodologías basadas en el análisis de proteínas representan una alternativa complementaria a los métodos genómicos, ya que reducen el tiempo de análisis, tienen un bajo coste, mostrando asimismo gran precisión y sensibilidad. Así, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo con la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, se demuestra que esta herramienta complementa el análisis genético basado en la secuenciación del gen 16S ADNr. Considerando las distintas partes de este estudio, es importante destacar las conclusiones obtenidas de una forma más pormenorizada, por lo que a continuación se enumeran conclusiones específicas correspondientes a cada uno de los capítulos que constituyen esta tesis doctoral.

5.2. Conclusiones específicas:

1. *Pseudomonas syringae* es un notable productor de histamina, generando concentraciones de esta amina en músculo de besugo similares a las producidas por *Morganella morganii*. Por otra parte, si bien el rodaballo de acuicultura es resistente a la formación de histamina a temperaturas inferiores a 10 °C, el besugo debe ser considerado una especie susceptible de mediar episodios de intoxicación histamínica alimentaria.

2. El análisis MALDI-TOF MS permite una rápida identificación de *Pseudomonas fragi* y *P. syringae*, principales bacterias productoras de histamina aisladas de rodaballo

y besugo de acuicultura, respectivamente, permitiendo asimismo definir biomarcadores específicos que permiten su detección rápida en productos alimentarios.

3. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta sensible y rápida para la detección e identificación de las principales bacterias productoras de aminas biógenas, proporcionando espectros y listas de masas característicos de cada especie bacteriana. El estudio filoproteómico realizado en este trabajo resultó idóneo para el agrupamiento microbiano, confirmando los resultados del análisis filogenético basado en el gen 16S ADNr.

4. *Streptococcus parauberis* puede causar la alteración de productos de la pesca refrigerados envasados al vacío limitando su vida útil, por lo que debe ser considerado como microorganismo específicamente alterante en este grupo de alimentos. En este estudio se han definido biomarcadores proteicos específicos que permiten su identificación directa en alimentos mediante MALDI-TOF.

5. Se ha desarrollado un método original de RTi-PCR que permite la determinación de *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* en alimentos frescos o pasteurizados, lo que puede permitir un control microbiológico estricto de estas especies patógenas y alterantes en todo tipo de alimentos.

6. Los picos de masa recopilados en este estudio han resultado ser biomarcadores útiles para la rápida identificación y clasificación de especies del género *Bacillus* patógenas y alterantes de alimentos. Así, el análisis mediante MALDI-TOF permite la diferenciación de las especies pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* y

Bacillus amyloliquefaciens) y al grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus* y *Bacillus thuringiensis*), mejorando de este modo el diagnóstico genético mediante secuenciación del gen 16S ADNr.

7. Se ha confirmado la presencia de SNPs en el 16S ADNr en el género *Bacillus*, describiéndose por vez primera en el presente estudio mutaciones en ciertos *loci* que deberán tenerse en cuenta para el diseño adecuado de oligonucleótidos y sondas orientadas a la investigación de estas especies en alimentos mediante PCR y microarrays

6.REFERENCIAS

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), 2009. Memoria 2009, consultado en http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/memoria/memoria_09.pdf
- Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology* 100, 352-364.
- Alm, R., Johansson, P., Hjerno, K., Emanuelsson, C., Ringner, M., Hakkinen, J., 2006. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of Proteome Research* 5, 785-792.
- Alvarez, V., Feas, X., Barros-Velazquez, J., Aubourg, S., 2009. Quality changes of farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) subjected to slaughtering and storage under flow ice and ozonised flow ice. *International Journal of Food Science Technology* 44, 1561-1571.
- Arnold, S., Price, R., Brown, W., 1980. Histamine formation by bacteria isolated from Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific* 46, 991-995.
- Baranowski, J.D., Frank, H. A., Brust, P. A., Chongsiriwatana, M., Premaratne, R. J., 1990. Distribution and histamine content in mahimahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Food Protection* 53, 217-222.
- Barros Velazquez, J., Jimenez, A., Villa, G., 2002. Speciation of thermotolerant *Campylobacter* isolates involved in foodborne disease by means of DNA restriction analysis and molecular probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6563-6568.

- Behling, A., Taylor, S., 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. *Journal of Food Science* 47, 1311-1314.
- Ben-Gigirey, B., De Sousa, J., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection* 61, 608-615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites, J., Kim, S., An, H., Villa, T., Barros-Velazquez, J., 2002. Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control* 13, 293-299.
- Böhme, K., Fernandez No, I., Barros Velazquez, J., Gallardo, J., Canas, B., Calo-Mata, P., 2010a. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Methods* 2, 1941-1947.
- Böhme, K., Fernandez-No, I., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J., Calo-Mata, P., Canas, B., 2010b. Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. *Journal of Proteome Research* 9, 3169-3183.
- Bourgeois, C.M y Zucca, J., 1994. Microbiología alimentaria I. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Ed Acribia 5, 107-111.
- Bright, J., Claydon, M., Soufian, M., Gordon, D., 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods* 48, 127-138.
- Carbonnelle, E., Beretti, J., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2156-2161.

- Chen, H., 1995. Seafood microorganisms and seafood safety. *Journal of Food and Drugs Analysis* 3, 3, 133-144.
- Chen, H., Kung, H., Chen, W., Lin, W., Hwang, D., Lee, Y., 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry* 106, 612-618.
- Chen, M., Tsen, H., 2002. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology* 92, 912-919.
- Choudhury, N., Hnsen, W., Engesser, D., Hammes, W., Holzapfel, W., 1990. Formation of histamine by lactic-acid bacteria in decarboxylase assay medium. *Letters in Applied Microbiology* 11, 278-281.
- Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., Mas, E., Poza, J., Rodellar, C., 2001. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa. *AquaTic* 15.
- Clifford, M., Walker, R., 1992. The etiology of scombrototoxicosis. *International Journal of Food Science Technology* 27, 721-724
- Clifford, M., Walker, R., Wright, J., Hardy, R., Murray, C., 1989. Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 47, 365-375.
- Dalgaard, P., 2006. Microbiology of Marine Muscle Foods. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering Vol. I Chapter 53*. CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida. 1-20
- Dare, D., 2006. Rapid bacterial characterization and identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Y.-W. Tang and C. W. Stratton. New York, Springer Science-Business Media, LLC 117-133.

- Demirev, P., Feldman, A., Lin, J., 2004. Bioinformatics-based strategies for rapid microorganism identification by mass spectrometry. Johns Hopkins APL Technical Digest 25, 27-37.
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U., von Dohren, H., 2005. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). Applied Microbiology and Biotechnology 67, 539-548.
- Domenech, A., FernandezGarayzabal, J., Pascual, C., Garcia, J., Cutuli, M., Moreno, M., 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L), associated with *Streptococcus parauberis*. Journal of Fish Diseases 19, 33-38.
- Donohue, M., Smallwood, A., Pfaller, S., Rodgers, M., Shoemaker, J., 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. Journal of Microbiological Methods 65, 380-389.
- Dubois, D., Leyssene, D., Chacornac, J., Kostrzewa, M., Schmit, P., 2010. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 48, 941-945.
- Duerden, B.I., Towner, K.J. and Magee, J.T., 1998. Isolation, description and identification of bacteria. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Systematic Bacteriology. L. Collier, A. Balows and M. Sussman. London 65-84.
- Easterday, W., Van Ert, M., Simonson, T., Wagner, D. et al., 2005. Use of single nucleotide polymorphisms in the plcR gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. Journal of Clinical Microbiology 43, 1995-1997.

- Eitenmiller, R., Wallis, J., Orr, J., Phillips, R., 1981. Production of histidine-decarboxylase and histamine by *Proteus morganii*. Journal of Food Protection 44, 815-820.
- Eitenmiller, R., Desouza, S., 1984. Enzymatic mechanisms for amine formation in fish. ACS Symposium Series 262, 431-442.
- Elizaquivel, P., Chenoll, E., Aznar, R., 2008. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. FEMS Microbiology Letters 278, 62-71.
- Emborg, J., Laursen, B.G., Daalgard, P., 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C- effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. International Journal of Food Microbiology 101, 263-279.
- Erhard, M., Hipler, U., Burmester, A., Brakhage, A., Woestemeyer, J., 2008. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. Experimental dermatology 17, 356-361.
- Fagerquist, C., Miller, W., Harden, L., Bates, A., Vensel, W., Wang, G., 2005. Genomic and proteomic identification of a DNA-binding protein used in the "fingerprinting" of *Campylobacter* species and strains by MALDI-TOF-MS protein biomarker analysis. Analytical Chemistry 77, 4897-4907.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2010. Empres para la inocuidad de los alimentos. Sistema de Prevención de Emergencias para la Inocuidad de los Alimentos. Plan Estratégico. Consultado en http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FAO-empresSPA_reduced.pdf
- FDA. (Food and Drugs Administration), 1996. Scombrototoxin (histamine) formation (a chemical hazard). Cap.7 in "Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide", Washington, D.C.

- Fernandez Salguero, J., Mackie, I., 1987. Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of Spanish canned fish. *International Journal of Food Science technology* 22, 409-412.
- Fernández, M., del Río, B., Linares, D.M., Martín, M.C., Alvarez, M.A., 2006. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in cheese production. *Journal of Dairy Science* 89, 3763-3769.
- Fletcher, G., Summers, G., Winchester, R., Wong, R., 1995. Histamine and histidine in New Zealand marine fish and shellfish species, particularly Kahawai (*Arripis trutta*). *Journal of Aquatic Food Product Technology* 4, 53 - 74.
- Flick, G., Hong, G., Knobl, G., 1992. Lipid oxidation of seafood during storage. *Lipid Oxidation in Food* 500, 183-207.
- Freiwald, A., Sauer, S., 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols* 4, 732-742.
- Fuji, T., Kurihara, K., Okuzumi, M., 1994. Viability and histidine-decarboxylase activity of halophilic histamine-forming bacteria during frozen storage. *Journal of Food Protection* 57, 611-613.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S., Kleinheinz, G., Robbins, M., Sandrin, T., 2010. Microbial fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and challenges. *Advances in Applied Microbiology* 71, 149-184.
- Gram, L., Oundo J. and Bon J., 1989. Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on storage temperature and initial bacterial load. *Tropical Science* 2, 221–236.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current opinion in Biotechnology* 13, 262-266.

- Gram, L., Huss, H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M., 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3122-3126.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis- Real - Time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11, 1026-1030
- Holland, R., Duffy, C., Rafii, F., Sutherland, J., Heinze, T., Holder, C., 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Analytical Chemistry* 71, 3226-3230.
- Honsa, E., Fricke, T., Stephens, A., Ko, D., Kong, F. 2008 Assignment of *Streptococcus agalactiae* isolates to clonal complexes using a small set of single nucleotide polymorphisms. *BMC microbiology*, 8.
- Hotta, Y., Sato, J., Sato, H., Hosoda, A., Tamura, H., 2011 Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in S10 and spc operons. *Journal Agriculture Food Chemistry* 59, 5222-5230.
- Hudson, J., Mott, S., 1993. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology* 10, 61-68.
- Huss, H., 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Documento técnico de pesca N° 348. FAO. Roma. Italia
- Huss, H., BenEmbarek, P., Jeppesen, V., 1995. Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control* 6, 335-340.

- Hwi-Chang Chen, Hsien-Feng Kung, Wen-Chieh Chen, Wen-Feng Lin, Deng-Fwu Hwang, Yi-Chen L., Yung-Hsiang T., 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. Food Chemistry 106, 612-618
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. Modern Food Microbiology, 101-124.
- Keim, P., Van Ert, M. N., Pearson, T., Vogler, A. J. et al., 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infection Genetics and Evolution 4, 205-213.
- Kiehntopf, M., Melcher, F., Haenel, I., ElAdawy, H., Tomaso, H., 2011. Differentiation of *Campylobacter* species by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Foodborne pathogens and disease 8, 875-885.
- Kim, R., 1979. Flushing syndrome due to mahimahi (scombroid fish) poisoning . Archives of Dermatology 115, 963-965.
- Kim, S., Barros-Velazquez, J., Ben-Gigrey, B., Eun, J., Jun, S., Wie, C., 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. Food Science and Biotechnology 12, 451-460.
- Kim, S.H., Ben-Gigrey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R.J., An, H., 2000. Histamine and biogenic amine formation by *Morganella morganii* isolated from temperature abused albacore. Journal of Food Protection 63, 244-251.
- Kim, S.H., Field, K., Morrissey, M., Price, R., Wei, C., An, H., 2001. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. Journal of Food Protection 64, 1035-1044.
- Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Bjorkroth, J., 2006. *Streptococcus parauberis* associated with modified atmosphere packaged broiler meat products and air

- samples from a poultry meat processing plant. *International Journal of Food Microbiology* 106, 318-323.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306.
- Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Staemmler, M., Siegbrecht, E., 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7229-7242.
- Lay, J., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 172-194.
- Liston, J., 1980. Microbiology in fishery science. In: J.J. Connell (Ed.), *Advances in Fishery Science and Technology*, 138-157. Fishing News Books. Farnham. UK.
- Lopez Sabater, E., Rodriguez Jerez, J., Hernandez Herrero, M., Mora Ventura, M., 1994. Evaluation of histidine-decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina plichardus*) by an enzymatic method. *Letters in Applied Microbiology* 19, 70-75.
- Mackie, I., 1997. The effects of post-mortem storage on fish muscle proteins. 185-189.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7046-7052.
- Marcobal A., De las Rivas B., Muñoz R., 2006. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 187–196.

- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino), 2010. Panel de Consumo del año 2008. Consultado en <http://www.marm.es>.
- Marth, E., 1998. Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. *Food Technology* 52, 57-62.
- Martinez-Blanch, J., Sanchez, G., Garay, E., Aznar, R., 2009. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 135, 15-21.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51, 143-148.
- Mazzeo, M., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., 2006. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1180-1189.
- Meer, R., Baker, J., Bodyfelt, F., Griffiths, M., 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. *Journal of Food Protection* 54, 969-979.
- Middlebrooks, B., Toom, P., Douglas, W., Harrison, R., McDowell, S., 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomurus-maculatus*). *Journal of Food Science* 53, 1024-1029.
- Miller III, A., Scanlon, R.A., Lee, J.S., Libbey, L.M., 1973. Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology* 25, 952-955.

- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive diseases* 9, 190-198.
- Monnet, C., Correia, K., Sarthou, A., Irlinger, F., 2006. Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6972-6979.
- Moorhead, S., Dykes, G., Cursons, R., 2003. An SNP-based PCR assay to differentiate between *Listeria monocytogenes* lineages derived from phylogenetic analysis of the sigB gene. *Journal Microbiology Methods* 55, 425-432.
- Morii, H., Cann, D., Taylor, L., 1988. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 299-305.
- Morrow, J., Margolies, G., Rowland, J., Roberts, L., 1991. Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *The New England Journal of Medicine* 324, 716-720.
- Mossel, D. A., Moreno, B.y Struijk, C.B., 2006. *Microbiología de los alimentos*. 2ª Edición. Editorial Acribia, S.A.: 37, 414-444.
- Mullis K.B., Faloona F. A., Scharf S., Saiki R. K., Horn G., Erlich H. A., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.
- Mullis K.B., Faloona F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350
- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., Zagorec, M., 2008. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology* 121, 342-351.

- Neethirajan, S., Jayas, D., 2011. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. Food and Bioprocess Technology 4, 39-47.
- Nho, S., Shin, G., Park, S., Jang, H., Cha, I., Ha, M., 2009. Phenotypic characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). FEMS Microbiology Letters 293, 20-27.
- NIFES. National Institute of Nutrition and Seafood Research. Seafood data P.O. Box 2029 Nordnes - 5817 Bergen – Norway . Available at www.nifes.no. Accesed 23 February 2011
- Niven, C., Jeffrey, M., Corlett, D., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Applied and Environmental Microbiology 41, 321-322.
- Nogva, H., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D., 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. Applied and Environmental Microbiology 66, 4266-4271.
- Oguntoyinbo, F., 2007. Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. African Journal of Biotechnology 6, 163-166.
- Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Fujii, T., 1994. *Photobacterium histaminum* sp. nov, a histamine-producing marine bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 631-636.
- Olofsson, T., Ahrne, S., Molin, G., 2007. The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7 degrees C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. Journal of Applied Microbiology 103, 109-119.
- Pan, B.S. and James, D., 1985. Histamine in marine products: production by bacteria,

- measurement and prediction of formation. FAO Fisheries Technical Paper 252-FIU/T252.Rome. Italy
- Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M., Savvaidis, I., 2008. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. Food Microbiology 25, 136-143.
- Pavic, S., Brett, M., Petric, N., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Archiv für Lebensmittelhygiene 56, 20-22.
- Pearson, T., Busch, J., Ravel, J., Read, T., Rhoton, S., 2004. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 13536-13541.
- Perez Martin, R., Franco, J., Aubourg, S., Gallardo, J., 1988. Changes in free amino-acids content in albacora (*Thunnus-alalunga*) muscle during thermal-processing. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 187, 432-435.
- Phillips, C., 1996. Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. International Journal of Food Science Technology 31, 463-479.
- Priest, F.G., Kaji, D.A., Rosato, Y.B., Canhos, V.P., 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms. Microbiology 140, 1015-1022.
- Qin, D., Abdi, N., Fredrick, K., 2007 Characterization of 16S rRNA mutations that decrease the fidelity of translation initiation. RNA 13, 2348-2355.

- Rawles, D. D., Flick. G. J. y Martin R. E., 1996. Biogenic amines in fish and shellfish. *Advances in Food y Nutrition Research* 39, 329-365.
- Reekmans, R., Stevens, P., Vervust, T., De Vos, P., 2009. An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine: a comparison study. *Letters in Applied Microbiology* 48, 97-104
- Reynisson, E., Lauzon, H., Magnusson, H., Hreggvidsson, G., Marteinsson, V., 2008. Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1357-1362.
- Rodriguez Jerez, J., Mora Ventura, M., Lopez Sabater, E., Hernandez Herrero, M., 1994. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semipreserved anchovies. *Journal of food protection* 57, 784-787.
- Rodriguez, O., Barros-Velazquez, J., Ojea, A., Pineiro, C., Aubourg, S., 2003. Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science* 68, 2764-2771.
- Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 51, 422-430.
- Ruelle V., Moualij B.E., Zorzi W., Ledent P. and Pauw E.D., 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2013-2019.
- Russell, S., 2009. Microorganism characterization by single particle mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* 28, 376-387.

- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., 1985. Enzymatic amplification of Beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Salas Salvadó, J., 2008. *Nutrición y dietética clínica*. Ed. Masson
- Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kampfer, P., Honkanen-Buzalski, T., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4637-4645.
- Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., 2008. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS One* 3.
- Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P., Bouvet, A., 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* subsp nov., *S. gallolyticus* subsp *macedonicus* subsp nov and *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus* subsp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 631-645.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J., 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49, 543-551.
- Shaw, B.G., Shewan, J.M., 1968. Psychrophilic Spoilage Bacteria of Fish. *Journal of Applied Microbiology* 31, 89-96.
- Shewan, J. M, 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In *Handling, processing and marketing of tropical fish*, 51-66. London, Tropical Products Inst.

- Shewan, J.M., 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes, J. Hawthorn, J. Muil Leitch, Editors Recent Advances in Food Science 1, 167-193.
- Smith T.A., 1980. Amines in food. Food Chemistry 6, 169-200.
- Smole S.C., King L.A., Leopold P.E. and Arbeit R.D., 2002. Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight. Journal Microbiological Methods 48, 107-115
- Sokurenko, E., Hasty, D., Dykhuizen, D., 1999. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. Trends Microbiology 7, 191-195.
- Sorokulova, I., Reva, O., Smirnov, V., Pinchuk, I., Lapa, S., Urdaci, M., 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rpy bread. Letters in Applied Microbiology 37, 169-173.
- Sukhadeo B. Barbuddhe, Thomas Maier, Gerold Schwarz, Markus Kostrzewa, Herbert Hof, Eugen Domann, Trinad Chakraborty and Torsten Hain., 2008. Rapid Identification and Typing of *Listeria* species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Applied and Environmental Microbiology 74, 17, 5402–5407.
- Taylor, S., 1986. Histamine food poisoning-toxicology and clinical aspects. CRC Critical Reviews in Toxicology 17, 91-128.
- Taylor, S., Guthertz, L., Leatherwood, M., Lieber, E., 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. Applied and Environmental Microbiology 37, 274-278.
- Taylor, S., Speckhard, M., 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. Marine Fisheries Review 45, 35-39.

- Taylor, S., Stratton, J., Nordlee, J., 1989. Histamine poisoning (Scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *Journal of toxicology.Clinical toxicology* 27, 225-240.
- teGiffel, M., Beumer, R., Klijn, N., Wagendorp, A., Rombouts, F.,1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 146, 47-51
- Tenbrink, B., Damink, C., Joosten, H., Tveld, J., 1990. Occurrence and formation of biologically-active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
- Thompson, J., Waites, W., Dodd, C., 1998. Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 85, 481-486.
- Tourova, T., 2003 Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. *Microbiology* 72, 389-402.
- van Baar, B., 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS microbiology reviews* 24, 193-219.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology* 27, 77-84.
- Vos, P., 2009. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2^a edición: 137-153
- Wang, L., Lee, F., Tai, C., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1846-1850.

- Wattiau, P., Renard, M., Ledent, P., Debois, V., Blackman, G., Agathos, S., 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 816-819.
- Welker, M., 2011. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and applied microbiology* 34, 2-11.
- WHO (World Health Organization), 2007. Fact Sheet Number 237: "Food safety and foodborne illness." Consultado en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>
- Williams, A., Collins, M., 1990. Molecular taxonomic molecular taxonomic studies on *Streptococcus-uberis* type I and type II. Description of *Streptococcus parauberis* sp.nov. *The Journal of Applied Bacteriology* 68, 485-490.
- Wolf, C., Rentsch, J., Hübner P., 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47, 1350-1355.
- Wu, X., Walker, M., Hornitzky, M., Chin, J., 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods* 64, 107-119.
- Yoshinaga, D., Frank, H., 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Applied and Environmental Microbiology* 44, 447-452.

7.ANEXO

Secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI)

1. Fernandez-No,I.C., Bohme,K., Calo-Mata,P. and Barros-Velazquez,J. *Pseudomonas fragi* strain **Turb47** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 791 bp linear DNA, JF414902.1 / GI:327387683
2. Fernandez-No,I.C., Bohme,K., Calo-Mata,P. and Barros-Velazquez,J. *Pseudomonas syringae* strain **Seab02** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 792 bp linear DNA, JF414901.1 / GI:327387682
3. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Proteus vulgaris* strain **ATCC 9484** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971888.1 / GI:239740579
4. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Proteus mirabilis* strain **ATCC 14153** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971887.1 / GI:239740578
5. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Klebsiella pneumoniae* strain **ATCC 10031** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 795 bp linear DNA, FJ971886.1 / GI:239740577
6. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Raoultella planticola* strain **ATCC 33531** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 795 bp linear DNA, FJ971885.1 / GI:239740576
7. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Hafnia alvei* strain **ATCC 9760** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971884.1 / GI:239740575
8. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Enterobacter cloacae* strain **ATCC 13047** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 795 bp linear DNA, FJ971883.1 / GI:239740574
9. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Enterobacter aerogenes* strain **ATCC 13048** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 795 bp linear DNA, FJ971882.1 / GI:239740573
10. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Staphylococcus xylosus* strain **ATCC 29971** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 804 bp linear DNA, FJ971865.1 / GI:239740556

11. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Lactobacillus* sp. **30A** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 829 bp linear DNA, FJ971864.1 / GI:239740555
12. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Stenotrophomonas maltophilia* strain **5PC6** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 799 bp linear DNA, FJ971863.1 / GI:239740554
13. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Stenotrophomonas maltophilia* strain **15MF** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971862.1 / GI:239740553
14. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Stenotrophomonas maltophilia* strain **25MC6** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971861.1 / GI:239740552
15. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Photobacterium phosphoreum* strain **CECT 4172** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 799 bp linear DNA, FJ971860.1 / GI:239740551
16. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Photobacterium damsela* strain **ATCC 33539** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 807 bp linear DNA, FJ971859.1 / GI:239740550
17. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Morganella morganii* strain **BM_65** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 798 bp linear DNA, FJ971858.1 / GI:239740549
18. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Gallardo,J.M., Canas,B.,Barros-Velazquez,J. and Calo-Mata,P. *Citrobacter freundii* strain **ATCC 8090** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 797 bp linear DNA, FJ971857.1 / GI:239740548
19. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Calo-Mata,P., Canas,B., Gallardo,J.M.and Barros-Velazquez,J. *Streptococcus parauberis* strain **83C-LHICA** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 803 bp linear DNA, JN630846.1 / GI:350627711
20. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Calo-Mata,P., Canas,B., Gallardo,J.M.and Barros-Velazquez,J. *Streptococcus parauberis* strain **83B-LHICA** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 803 bp linear DNA, JN630845.1 / GI:350627710

21. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Calo-Mata,P., Canas,B., Gallardo,J.M.and Barros-Velazquez,J ***Streptococcus parauberis* strain DSM 6632** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 803 bp linear DNA, JN630844.1 / GI:350627709
22. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Calo-Mata,P., Canas,B., Gallardo,J.M.and Barros-Velazquez,J ***Streptococcus parauberis* strain DSM 6631** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 803 bp linear DNA, JN630843.1 / GI:350627708
23. Fernandez-No,I.C., Boehme,K., Calo-Mata,P., Canas,B., Gallardo,J.M.and Barros-Velazquez,J ***Streptococcus uberis* strain ATCC 19436** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 803 bp linear DNA, JN630842.1 / GI:350627707